

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de Enero de 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/001176 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes?: **G01N**

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00308

(22) Fecha de presentación internacional:
24 de Junio de 2002 (24.06.2002)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 0101476 26 de Junio de 2001 (26.06.2001) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COM-
POSTELA [ES/ES]; CITIT - Edificio CACTUS, Campus
Sur, E-15782 Santiago de Compostela (ES).**

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **ZAPATA**

BABIO, José Carlos [ES/ES]; Universidade de Santiago
de Compostela, Depto de Xenetica, Facultade de Biología,
E-15782 Santiago de Compostela (ES). **RODRIGUEZ
LOPEZ, Santiago [ES/ES];** Universidade de Santiago de
Compostela, Depto de Xenetica, Facultade de Biología,
E-15782 Santiago de Compostela (ES).

(81) Estados designados (nacional): AU, CA, US, ZA.

(84) Estados designados (regional): patente euroasiática (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada rue-
vamente cuando se reciba dicho informe

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: GEDAP METHOD (GENOTYPING BASED ON DIAGNOSTIC AMPLIFICATION PRODUCTS) FOR DETECTING
AND/OR PREVENTING GENOTYPING ERRORS FROM AMPLIFICATION PRODUCTS OF A POLYMORPHIC LOCUS

(54) Título: METODO GEDAP (GENOTYPING BASED ON DIAGNOSTIC AMPLIFICATION PRODUCTS) PARA DETEC-
TAR Y/O PREVENIR ERRORES DE GENOTIPADO A PARTIR DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACION DE UN LOCUS
POLIMORFICO

(57) Abstract: The invention relates to a GEDAP method (Genotyping Based on Diagnostic Amplification Products) for detecting
and/or preventing genotyping errors from amplification products of a polymorphic locus. The method is based on the joint analysis
of homoduplexes and additional diagnostic products (PAD) generated from the amplification of the alleles of a polymorphic locus.
The method is highly effective in detecting and/or preventing genotyping errors due to total or partial non-amplification occurring
during the amplification process, including polymerase chain reaction (PCR).

(57) Resumen: Metodo GEDAP (Genotyping Based on Diagnostic Amplification Products) para detectar y/o prevenir errores de
genotipado a partir de los productos de amplificación de un locus polimórfico. El metodo se basa en el análisis conjunto de homo-
duplexes y Productos 5 Adicionales con valor Diagnóstico (PAD) generados a partir de la amplificación de los alelos de un locus
polimórfico. El metodo es altamente efectivo para detectar y/o prevenir errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales
o parciales producidas durante el proceso de amplificación, incluida la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).



WO 03/001176 A2

TÍTULO

Método GEDAP (Genotyping Based on Diagnostic Amplification Products) para detectar y/o prevenir errores de genotipado a partir de los productos de amplificación de un locus polimórfico.

5

DESCRIPCIÓN

Un método para genotipar loci polimórficos por medio del análisis de los productos generados a partir de la amplificación de los alelos contenidos en muestras diploides o poliploides. Más específicamente, se refiere a un método para detectar y/o prevenir errores de genotipado originados por no-amplificaciones totales o parciales de los alelos, producidas durante el proceso de amplificación. También se refiere a las aplicaciones genéticas y a los sistemas que pueden utilizar de forma efectiva esa información genotípica, tales como la diagnosis de enfermedades, la diagnosis genética preimplantacional, los tests de paternidad, los análisis forenses, la terapia génica, el transplante de tejidos y órganos, la farmacogenética, la genética de poblaciones, el mapado genómico y la genética epidemiológica.

El genotipado es el punto de partida imprescindible para llevar a cabo la mayor parte de los estudios genéticos, tanto en su vertiente básica como en su vertiente aplicada y ha contribuido decisivamente al gran desarrollo de la Genética y de sus aplicaciones. El genotipado de loci polimórficos de DNA se ha visto facilitado en los últimos años por dos avances fundamentales: la invención de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ("Polymerase Chain Reaction", PCR) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986) y el descubrimiento de gran cantidad de secuencias polimórficas de DNA a lo largo de los genomas (fundamentalmente marcadores de DNA con repeticiones en tándem de uno o más nucleótidos) (Dib *et al.*, 1996; Tóth *et al.*, 2000). Ambos avances han contribuido decisivamente, entre otros aspectos, al conocimiento de la estructura y función de los genomas de los seres vivos y al desarrollo de la genética de poblaciones, de la genética epidemiológica, del mapado genómico, de la terapia génica, de la diagnosis de enfermedades, de la diagnosis genética preimplantacional, de los análisis forenses, del transplante de tejidos y órganos, de la farmacogenética, de los tests de paternidad, etc.

Los métodos convencionales utilizados para genotipar loci polimórficos de DNA se basan en la siguiente estrategia: (a) amplificar los alelos del locus presentes en una muestra (generalmente por medio de la PCR); (b) identificar los alelos amplificados (generalmente por medio de electroforesis); y (c) determinar el genotipo de la muestra a partir de los alelos amplificados.

Esta estrategia de genotipado debería garantizar que el genotipo determinado a partir de los productos de amplificación es en efecto el genotipo real de la muestra. En la práctica, sin embargo, los métodos convencionales de genotipado llevan asociado un porcentaje de error, variable según las condiciones experimentales utilizadas.

5 Los errores de genotipado tienen repercusiones muy negativas en los análisis genéticos y en las aplicaciones derivadas de los análisis genéticos. Obviamente, los errores de genotipado pueden tener repercusiones especialmente graves cuando provocan la identificación errónea de individuos humanos, ya sea en análisis criminalísticos, en análisis de paternidad, etc. Asimismo, los errores de genotipado pueden provocar
10 diagnósis médicas incorrectas especialmente perniciosas en el caso de la diagnóstico de enfermedades, la diagnóstico preimplantacional, el transplante de tejidos y órganos, etc. Por otra parte, es conocido que los errores de genotipado condicionan negativamente la exactitud de los análisis genéticos, provocando serios inconvenientes tales como pérdida de potencia en estudios de mapado genómico, distorsión significativa de las distancias de
15 mapa, infraestimación de la fuerza de las correlaciones entre loci marcadores y rasgos de enfermedades y falsa exclusión de la verdadera localización de un gen que predispone a padecer una enfermedad (Buetow, 1991; Goldstein *et al.*, 1997; Göring y Terwilliger, 2000). El efecto negativo de los errores de genotipado puede ser aún mayor en los análisis de desequilibrio gamético (Zapata *et al.*, 2001a; Zapata *et al.*, 2001b), ya que un único
20 error de genotipado puede destruir la evidencia de meiosis no recombinantes producidas a lo largo de la historia de una población (Terwilliger *et al.*, 1997; de La Chapelle y Wright, 1998; Göring *et al.*, 1997; Göring y Terwilliger, 2000; Akey *et al.*, 2001).

Una fuente importante de errores de genotipado es la existencia de fallos durante la amplificación que provocan la ausencia total o parcial del producto de amplificación de
25 al menos uno de los alelos originalmente presentes en la muestra. La ausencia parcial del producto de amplificación de un alelo, o no-amplificación parcial, también es conocida como amplificación preferencial (Walsh *et al.*, 1992). La ausencia total del producto de amplificación de un alelo, o no-amplificación total, también es conocida como "allele dropout" (Findlay *et al.*, 1995; Gagneux *et al.*, 1997) y alelos nulos (Pemberton *et al.*,
30 1995).

La ocurrencia de este tipo de fallos a lo largo del proceso de amplificación tiene importantes consecuencias. En el caso de muestras diploides heterocigóticas, las no-amplificaciones totales y algunas no-amplificaciones parciales provocan el genotipado

erróneo de esas muestras como homocigóticas (Demers *et al.*, 1995; Findlay *et al.*, 1995; Pemberton *et al.*, 1995; Fishback *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000).

Dada la repercusión que tienen los errores de genotipado en los análisis genéticos y en las aplicaciones genéticas, se está haciendo un esfuerzo considerable para:

- 5 1.- Conocer las causas de las no-amplificaciones totales y parciales.
- 2.- Intentar detectar y/o prevenir los errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales y parciales.

1.- Causas de las no-amplificaciones totales y parciales

- 10 Estudios recientes están permitiendo conocer las causas que provocan la ocurrencia de las no-amplificaciones totales y parciales. Diversos factores pueden originar la no-amplificación parcial de un alelo en muestras diploides tales como: (a) diferencias significativas en el contenido GC de los alelos de una muestra heterocigótica (estas diferencias pueden conducir a la desnaturalización de sólo uno de los dos alelos,
- 15 fenómeno conocido como desnaturalización diferencial) (Walsh *et al.*, 1992); (b) diferencias en el tamaño de los dos alelos que conducen a la amplificación preferencial del alelo de menor tamaño (esta amplificación preferencial está probablemente favorecida cuando la concentración de la *Taq* polimerasa es limitante) (Walsh *et al.*, 1992); (c) fluctuaciones estocásticas en el número de copias de cada alelo (Walsh *et al.*, 1992); (d)
- 20 hibridaciones incompletas entre los primers y uno de los alelos (se pueden originar como consecuencia de la existencia de mutaciones en la región de primado) (Walsh *et al.*, 1992); (e) daños en el DNA molde (debidos a irradiación con luz ultravioleta o a la adición de sales monovalentes tales como cloruro sódico, acetato sódico o acetato amónico) (Mutter y Boynton, 1995); (f) baja estringencia en el primado entre los primers
- 25 y el DNA molde (se puede originar como consecuencia de la amplificación simultánea de una muestra y un control interno para estimar el tamaño de los alelos amplificados, o como consecuencia de la amplificación simultánea de más de una secuencia polimórfica) (Weissensteiner y Lanchbury, 1996).

- Diversos estudios sugieren que la no-amplificación total puede ser el resultado de
- 30 una no-amplificación parcial extrema (Findlay *et al.*, 1995; Ronai *et al.*, 2000). Por tanto, los mecanismos que provocan la existencia de no-amplificación parcial también pueden provocar no-amplificación total. Por otra parte, otras evidencias indican que la no-amplificación total se produce con una frecuencia especialmente elevada si la muestra posee una cantidad muy reducida de la secuencia que se pretende genotipar (Gagneux *et*

al., 1997; Lissens y Sermon, 1997). Esta situación se cumple cuando se genotipa un locus a partir de una única célula (por ejemplo, en el caso de la diagnosis genética preimplantacional), o a partir de restos biológicos degradados o con poco DNA (por ejemplo, en diversos análisis forenses). En esos casos, la no-amplificación total se ve
5 favorecida por factores tales como (a) el mosaicismo cromosómico, y más específicamente, la presencia de células haploides en un embrión diploide (Harper *et al.*, 1995); (b) el método utilizado para lisar la célula antes de la PCR (Lissens y Sermon, 1997, y referencias citadas en el mismo); (c) la temperatura utilizada durante el primer ciclo de desnaturalización de la PCR (Ray y Handyside, 1996); (d) las roturas en el DNA
10 producidas por endonucleasas endógenas (Lissens y Sermon, 1997); (e) el uso de condiciones de PCR subóptimas (Handyside y Delhanty, 1997); y (f) la degradación rápida del DNA molde durante el proceso de termociclación (Handyside y Delhanty, 1997).

15 2.- Detección y/o prevención de errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales y parciales

Se han propuesto diversas mejoras de los métodos convencionales de genotipado para detectar y/o prevenir los errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales y parciales. Básicamente se pueden agrupar en dos tipos: (2.1) métodos directos y (2.2)
20 métodos indirectos.

2. 1.- Métodos directos

Los métodos directos se basan en (a) mejora de las condiciones de amplificación para prevenir la ocurrencia de no-amplificaciones totales o parciales y (b) mejora del
25 sistema de detección de los alelos amplificados.

(a) Mejora de las condiciones de amplificación

Entre las optimizaciones de las condiciones de amplificación sugeridas para intentar prevenir la ocurrencia de no-amplificaciones parciales se encuentran: (a) no
30 utilizar una concentración de DNA molde superior a 200 ng ni un tiempo de extensión en cada ciclo superior a 2 minutos (Deka *et al.*, 1992); (b) sustituir el dGTP por 7-deaza-2'-dGTP (Mutter y Boynton, 1995) o por 2'-desoxiinosina-5'-trifosfato (dITP) (Ronai *et al.*, 2000); (c) utilizar PNA ("Peptide Nucleic Acid") a lo largo del proceso de amplificación (Demers *et al.*, 1995); (d) utilizar cosolutos desestabilizantes de DNAs de doble cadena

tales como la betaína y el glicerol (Weissensteiner y Lanchbury, 1996); (e) incrementar la concentración de KCl (Fishback *et al.*, 1999).

Entre las optimizaciones de las condiciones de amplificación sugeridas para intentar prevenir la ocurrencia de no-amplificaciones totales se encuentran: (a) incrementar la temperatura de desnaturalización (Lissens y Sermon, 1997); (b) realizar "whole-genome amplification" por medio de "primer extension pre-amplification" (PEP) seguida por "nested PCR" (Handyside y Delhanty, 1997); (c) aproximaciones para incrementar la cantidad de DNA molde, tales como realizar la biopsia de más de una célula del embrión (Harper *et al.*, 1996), incrementar el número de células fetales a partir del fluidos maternos (Garvin *et al.*, 1998), etc.

(b) Mejora del sistema de detección de los alelos amplificados

Paralelamente, se han propuesto mejoras en el sistema de detección de los alelos amplificados con objeto de intentar detectar errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales. Por ejemplo, Findlay *et al.* (1995) han demostrado que la PCR fluorescente permite reducir la tasa de errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales. Esto se debe a que la PCR fluorescente, mucho más sensible que la PCR convencional, permite detectar muestras clasificadas por la PCR convencional como muestras homocigóticas que son en realidad muestras heterocigóticas con no-amplificación parcial extrema.

En este sentido, se ha asumido que el método definitivo para el genotipado de alta resolución es la detección de polimorfismos a través de la secuenciación automática fluorescente por medio del uso de secuenciadores automáticos basados en la electroforesis capilar tales como el ABI PRISM 310 o el ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, 2001). Este método podría detectar potenciales errores de genotipado debidos a no-amplificaciones parciales. Sin embargo, el problema de genotipado asociado con la no-amplificación total no se resuelve incluso cuando se usan secuenciadores automáticos tales como el ABI PRISM 310 (Garvin *et al.*, 1998). De hecho, estudios recientes señalaron que los errores de genotipado son inevitables (Douglas *et al.*, 2000; Göring y Terwilliger, 2000) y que son muy difíciles o imposibles de detectar cuando no se dispone de información mendeliana (Weeks *et al.*, 2000).

Consecuentemente, tanto las mejoras en las condiciones de amplificación como en el sistema de detección propuestas, no permiten prevenir completamente la ocurrencia de

no-amplificaciones totales o parciales ni detectar la totalidad de errores de genotipado debidos a estos fallos en la PCR.

2. 2.- Métodos indirectos

5 Una alternativa para poder detectar errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales es recurrir a métodos indirectos. Entre estos métodos se encuentran (a) repetir la reacción un número de veces tal que permita descartar un posible error de genotipado, y (b) el análisis mendeliano.

10 (a) Repetición de la amplificación

Se ha sugerido que la realización de tres réplicas en el análisis genético de una muestra (es decir, repetir tres veces la amplificación a partir de la muestra y la detección de los alelos amplificados) debería detectar un 95% de los errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales (Gagneux *et al.*, 1997). Asimismo, Taberlet *et al.* 15 (1996) han propuesto que este porcentaje se incrementa hasta un 99% cuando se realizan siete réplicas, aunque existe discusión en este sentido (Weissensteiner, 1997; Taberlet, 1997).

Sin embargo, esta estrategia presenta dos limitaciones fundamentales. En primer lugar, no permite identificar *a priori* las muestras que han podido sufrir no-amplificación total o parcial. Esto obligaría a realizar réplicas de todas las muestras que son 20 aparentemente homocigóticas, dado que los métodos convencionales de genotipado no permiten diferenciar entre muestras homocigóticas y muestras heterocigóticas con no-amplificación total. Obviamente, esta aproximación es difícilmente abordable en estudios que requieren el genotipado de un amplio tamaño muestral (por ejemplo, en el caso de los 25 “genome scans” y en el caso de un gran número de estudios poblacionales y estudios epidemiológicos). En segundo lugar, la posible aplicación de esta estrategia se ve seriamente limitada por la disponibilidad de DNA, ya que, en ocasiones, la cantidad de DNA disponible es muy reducida (por ejemplo, en estudios de genética preimplantacional, en estudios forenses en los que las muestras están degradadas, cuando 30 se parte de muestras con poco DNA, tales como pelos, etc.).

(b) Análisis mendeliano

Otro método indirecto que permite detectar un amplio espectro de errores de genotipado es el análisis mendeliano (Ewen *et al.*, 2000). Sin embargo, no siempre es

posible recurrir a este procedimiento, ya que en ocasiones se carece de muestras relacionadas biológicamente con la muestra objeto de estudio. Además, se ha descrito que el análisis mendeliano no siempre permite detectar errores de genotipado. Esta situación se cumple especialmente cuando los núcleos familiares estudiados son pequeños (Weeks
5 *et al.*, 2000).

Por todo lo expuesto, resulta evidente que los métodos convencionales, basados en el genotipado a partir de los alelos amplificados, no son eficientes para detectar y/o prevenir errores de genotipado debidos a amplificaciones totales o parciales. Notablemente, estos errores de genotipado se siguen produciendo incluso tras la
10 aplicación de mejoras derivadas del uso de métodos directos e indirectos para detectarlos y/o prevenirlos específicamente. Por lo tanto, existe una clara necesidad de un nuevo método de genotipado que permita detectar y prevenir de forma efectiva los errores ocasionados por no-amplificaciones totales o parciales.

15 Recientemente, se ha descrito que ciertos productos generados por la PCR durante la amplificación de los alelos (concretamente heterodúplexes) pueden ser utilizados como una fuente de información adicional en la identificación de muestras heterocigóticas (Wilkin *et al.*, 1993; Neilan *et al.*, 1994; Ardren *et al.*, 1999) y en la detección de homoplasia (Szibor *et al.*, 1996; Haddad *et al.*, 1997; Ardren *et al.*, 1999). Sin embargo,
20 estos trabajos no han considerado que los productos adicionales a los alelos amplificados pueden ser útiles en la detección y/o prevención de errores de genotipado producidos por no-amplificaciones totales o parciales.

En la presente invención, proponemos un método de genotipado, denominado Genotyping Based on Diagnostic Amplification Products (GEDAP), que permite detectar
25 y/o prevenir de forma efectiva errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales. El método es reproducible, muy fiable y preciso. Se basa en una estrategia de genotipado distinta a la empleada por los métodos convencionales. El método GEDAP consiste en promover la formación de homodúplexes de los alelos amplificados y de otros Productos Adicionales con valor Diagnóstico (PAD) y analizarlos conjuntamente para
30 determinar el genotipo de un locus polimórfico a partir de una muestra diploide o poliploide. En concreto, promueve la formación de PAD específicos de genotipo y PAD específicos de alelo. El análisis combinado de estos dos tipos de PAD y de los homodúplexes de los alelos amplificados, es utilizado por el método GEDAP para poner

en evidencia si se ha producido, o no, no-amplificación total o parcial de al menos un alelo durante el proceso de amplificación del locus polimórfico de interés.

Así, en un aspecto, GEDAP permite detectar errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales, en base a la detección de combinaciones anómalas de homodúplexes y PAD. En otro aspecto, también permite prevenir errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales, en base a la detección de combinaciones esperadas de homodúplexes y PAD específicas de cada genotipo.

El método GEDAP solventa en gran medida las limitaciones de los métodos convencionales. Así, permite identificar con gran precisión los productos de amplificación que han sufrido no-amplificación total o parcial, por lo que el número de réplicas necesario para detectar los errores de genotipado asociados con esos fallos se reduce considerablemente. Por otra parte, el método GEDAP proporciona un control interno de la calidad de la amplificación, por lo que no es necesario recurrir a métodos indirectos para detectar y/o prevenir errores de genotipado. Además, puede ser automatizado parcial o totalmente, por lo que puede ser utilizado para optimizar el genotipado a gran escala ("high throughput genotyping").

El método GEDAP es aplicable a todos los organismos diploides o poliploides, tales como organismos animales y organismos vegetales. Asimismo, es igualmente aplicable para determinar el genotipo de organismos transgénicos y de organismos clonados. En la práctica, su uso será más extendido en organismos con aplicaciones útiles o comercialmente beneficiosas, tales como el hombre y los organismos de interés para el hombre.

A título ilustrativo, se demuestra que el método GEDAP permite detectar y/o prevenir de forma efectiva errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales producidas durante la amplificación de microsatélites de naturaleza dinucleotídica. Por lo tanto, es útil en las aplicaciones derivadas del uso de estos marcadores de DNA. En la industria biotecnológica es de aplicación, por ejemplo, en la diagnosis de enfermedades, la diagnosis genética preimplantacional, la terapia génica, el trasplante de tejidos y órganos, la farmacogenética, los tests de paternidad, los análisis forenses y la elaboración o el perfeccionamiento de programas informáticos para el genotipado. En ciencia básica es de aplicación, por ejemplo, en genética de poblaciones y en el mapado genómico.

Estos y otros objetivos, características y ventajas del nuevo método de genotipado GEDAP serán comprendidos en mayor profundidad por una persona con conocimientos

básicos en el campo tras la lectura de la siguiente descripción detallada, ilustrada con las figuras que se adjuntan a continuación.

Descripción de las figuras:

- 5 La figura 1 muestra un esquema del genotipado de un locus polimórfico (A) con dos alelos distintos (A_X , A_Y) a partir de muestras diploides.
- La figura 2 muestra un esquema de la base de los métodos convencionales de genotipado.
- La figura 3 muestra un esquema de la base del método GEDAP.
- 10 La figura 4 ilustra esquemáticamente errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales y parciales que no se pueden detectar ni prevenir mediante los métodos convencionales de genotipado.
- La figura 5 ilustra esquemáticamente la detección y prevención de errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales y parciales mediante el método GEDAP.
- 15 La figura 6 muestra la resolución y la precisión del sistema electroforético, en base a los valores de $R(f)$ de los alelos de seis microsátélites de naturaleza dinucleotídica.
- La figura 7 corresponde a dos geles que ilustran cómo las condiciones electroforéticas no desnaturalizantes favorecen la presencia de PAD, en comparación con las condiciones electroforéticas desnaturalizantes.
- 20 La figura 8 ilustra esquemáticamente las bandas correspondientes a los homodúplexes ("homoduplex bands"), a los PAD-AL ("diagnostic shadow bands" y "stutter bands"), a los PAD-HOM ("faint bands") y a los PAD-HET ("heteroduplex bands").
- La figura 9 ilustra esquemáticamente la detección de errores de genotipado mediante el método GEDAP, a través de la identificación de patrones de bandas anómalos (B y C), en comparación con los patrones de bandas normales (A y D).
- 25 La figura 10 corresponde a un gel que ilustra la prevención de errores en el genotipado de muestras heterocigóticas mediante el método GEDAP, a través del análisis combinado de "homoduplex bands", "diagnostic shadow bands", "stutter bands", "faint bands" y "heteroduplex bands".
- 30 La figura 11 corresponde a un gel que ilustra una aparente exclusión de parentesco detectada por medio del microsátélite de naturaleza dinucleotídica D11S1760.

La figura 12 corresponde a un gel que ilustra cómo el método GEDAP permite demostrar que la aparente exclusión de parentesco es en realidad un error de genotipado debido a una no-amplificación total

5 MODO DE REALIZACIÓN

A continuación se describe en detalle cómo aplicar el método GEDAP. En un primer lugar, se describe cómo generar e identificar los homodúplexes y los Productos Adicionales con valor Diagnóstico (PAD). En segundo lugar, se describe cómo se pueden detectar y/o prevenir errores de genotipado y las ventajas que presenta GEDAP en relación a los métodos convencionales. En tercer lugar, se evalúa la eficiencia del método. Finalmente, se muestran dos ejemplos para ilustrar algunas de las aplicaciones de la presente invención.

15 A) GENERACION E IDENTIFICACION DE HOMODUPLEXES Y PAD

El locus que se puede genotipar mediante el método GEDAP es cualquier secuencia de ácido nucleico de la que se conozcan al menos dos alelos distintos. El locus preferido en la presente encarnación es cualquier marcador de DNA con repeticiones en tándem de uno o más nucleótidos.

El proceso de genotipado del locus comienza obteniendo cualquier muestra que contenga, o que se presuma que contenga, al menos dos alelos del locus que se pretende analizar. Las muestras preferidas en la presente encarnación son muestras de sangre de individuos humanos.

Una vez obtenida la muestra, se procede a amplificar los alelos del locus bajo condiciones que induzcan la formación de homodúplexes y PAD. La amplificación se puede llevar a cabo a partir de los ácidos nucleicos contenidos en la muestra, sin aislarlos del resto de los componentes (e.g. Yue *et al.*, 2001). Otra posibilidad consiste en purificar los ácidos nucleicos previamente a la amplificación. En la encarnación preferida, el DNA se purifica previamente a la amplificación de los alelos. Existen numerosos métodos estándar para purificar el DNA a partir de sangre, otros tejidos, pelo, heces, saliva, etc. En la encarnación preferida, el DNA se purifica por medio de un kit comercial de purificación de DNA a partir de muestras de sangre total (QIAamp blood kit, QIAGEN).

Una técnica idónea para amplificar los alelos del locus bajo condiciones que induzcan la formación de homodúplexes y PAD es la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), aunque se pueden utilizar otros procedimientos para amplificar

secuencias de DNA o RNA tales como "Nucleic Acid Sequence Based Amplification" (NASBA), "Transcription-based Amplification System" (TAS), "Self-sustained Sequence Replication" (3SR), "Q-beta replicase", "Ligation Amplification Reaction" (LAR) y "Ligase Chain Reaction" (LCR) (Dr bek, 2001)). La PCR permite la amplificación *in vitro* de una o más secuencias específicas de DNA presentes en un ácido nucleico o en una mezcla de ácidos nucleicos por medio del uso de primers y agentes para la polimerización. Cuando el producto de extensión de un primer hibrida con el otro primer, pasa a ser un molde para la producción de la secuencia deseada y viceversa. Este proceso se repite el número de veces necesario para producir la cantidad deseada de la secuencia.

10 El método de la PCR que se refleja a continuación es estándar y puede ser utilizado fácilmente para amplificar cualquier marcador de DNA con repeticiones en tándem de uno o más nucleótidos.

En la encarnación preferida para llevar a cabo la amplificación, el ácido nucleico de la muestra se mezcla con otros componentes de la mezcla de reacción de la PCR. Esos otros componentes incluyen, pero no están limitados a, el tampón de la PCR estándar (que contiene Tris pH 8,0, 2,5 mM KCl, cloruro magnésico), los desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), la polimerasa termoestable (*e.g.* *Taq* polimerasa) y los primers. La cantidad total de cada uno de los componentes de esta mezcla depende del volumen final de la mezcla de reacción y el número de reacciones que se pretendan realizar.

20

Las secuencias de los primers y las condiciones específicas adecuadas para amplificar cada marcador se pueden obtener a partir de las bases de datos disponibles (por ejemplo, Genome Database, GDB: <http://www.gdb.org> o Généthon: <http://www.genethon.fr>). Los primers para amplificar cada marcador se pueden sintetizar (véase, por ejemplo, Beacauge *et al.*, 1981; Caruthers *et al.*, 1988; Haralambidis *et al.*, 1990) o bien adquirir a casas comerciales. Los primers también se pueden marcar para facilitar su detección (por ejemplo: con fluorocromos, radioisótopos, ligandos que permitan su detección mediante quimioluminiscencia, ligandos para su detección inmunohistoquímica tales como la digoxigenina, etc).

25

Las reacciones de PCR se llevan a cabo calentando y enfriando la muestra de reacción a las temperaturas específicas establecidas y descritas para cada marcador. Típicamente, el protocolo de termociclación consiste en:

30

- a) Un paso inicial de desnaturalización (p. ej. 94°C durante 3 minutos)
- b) Repetir de 20 a 40 veces:

- b1.- un paso de desnaturalización (p. ej. 94°C durante 30 segundos)
- b2.- un paso de primado o annealing (p. ej. 55°C durante 30 segundos)
- b3.- un paso de elongación (p. ej. 72°C durante 30 segundos)
- c) Un paso final de elongación (p. ej. 72°C durante 2 minutos).

- 5 Las condiciones experimentales utilizadas en la PCR favorecen la generación de homodúplexes de los alelos amplificados y la generación de otros productos adicionales, entre los que se encuentran los PAD. En concreto, la desnaturalización de los ácidos nucleicos presentes en la mezcla de reacción utilizada durante la PCR y su posterior renaturalización es una fuente importante de homodúplexes y otros productos adicionales.
- 10 El número de homodúplexes y productos adicionales generados en la PCR depende, en primera instancia, de si los ácidos nucleicos resultantes de la amplificación tienen una secuencia distinta o no. Así, en las mezclas de reacción de muestras homocigóticas (en las que los alelos del locus tienen la misma secuencia), los sucesivos ciclos de desnaturalización y renaturalización generarán un solo tipo de homodúplex. Por el
- 15 contrario, en las mezclas de reacción de muestras heterocigóticas (en las que al menos dos alelos del locus tienen secuencias diferentes), dichos ciclos generarán un número de homodúplexes igual al número de secuencias distintas presentes en esas mezclas de reacción. Además, en el caso de muestras heterocigóticas, los sucesivos ciclos de desnaturalización y renaturalización también inducirán la formación de heterodúplexes.
- 20 Estos surgen como consecuencia de la hibridación de dos cadenas procedentes de ácidos nucleicos con secuencias distintas.

- Además de los homodúplexes y los heterodúplexes mencionados, la PCR también induce la formación de otros productos adicionales distintos. Por ejemplo, cuando la *Taq* polimerasa lleva a cabo el proceso de elongación, puede cometer errores que provocan la
- 25 síntesis de ácidos nucleicos con una secuencia distinta a la secuencia del DNA molde. Uno de estos errores, producido por el mecanismo conocido como "DNA slippage", se da con relativa frecuencia en el transcurso de la amplificación de marcadores microsatélites con repeticiones de uno o más nucleótidos. Así, en el caso de marcadores microsatélites de naturaleza dinucleotídica, el "slippage" genera la formación de ácidos nucleicos que
- 30 presentan una ganancia o una pérdida de una unidad repetitiva (2 nucleótidos) con respecto al DNA molde original, aunque la probabilidad de perder una unidad repetitiva es mucho mayor que la probabilidad de ganarla (Miller y Yuan, 1997). Por tanto, los sucesivos ciclos de desnaturalización y renaturalización inducirán la generación de ácidos nucleicos de doble cadena, distintos a los homodúplexes, que resultarán de la hibridación

de dos cadenas complementarias generadas por "slippage". Asimismo, también se podrán formar nuevos heterodúplexes, que resultarán de la hibridación entre las cadenas generadas por "slippage" y las cadenas de los alelos.

Por otra parte, la PCR también puede originar otros tipos de productos adicionales. Así, se ha descrito que ciertos oligonucleótidos tienen la tendencia a unirse al DNA de doble cadena y formar tríplexes intermoleculares estables (Durland *et al.*, 1991; revisión de Frank-Kamenetskii y Mirkin, 1995). Por tanto, una nueva fuente de productos adicionales es la generación de tríplexes a través de la unión de al menos uno de los primers utilizados para la amplificación y cualquiera de los ácidos nucleicos de doble cadena presentes en la mezcla de reacción. De forma análoga, otros componentes de la mezcla de reacción utilizada en la amplificación también pueden inducir la formación de tríplexes intermoleculares. Así, se ha descrito que el análogo de DNA "Peptide Nucleic Acid" (PNA), utilizado en la PCR para estimular la amplificación del DNA y reducir la ocurrencia de amplificación preferencial (Demers *et al.*, 1995), también induce la formación de tríplexes (revisión de Frank-Kamenetskii y Mirkin, 1995).

Una vez finalizada la PCR, se pueden generar muchos otros tipos de productos adicionales. Entre las causas que pueden inducir la formación de estos nuevos productos adicionales se encuentran la formación de complejos entre los componentes de la mezcla de reacción y la existencia de cambios conformacionales de los ácidos nucleicos generados por la PCR. Por ejemplo, es conocido que fragmentos de DNA con repeticiones en tándem del dinucleótido CA se asocian espontáneamente entre sí *in vitro* formando estructuras estables de cuatro cadenas que pueden ser detectadas mediante electroforesis y microscopía electrónica (Gaillard y Strauss, 1994). Asimismo, el motivo GA confiere un considerable polimorfismo conformacional al DNA, lo que incluye la formación de tetráplexes (Lee, 1990), "single-stranded acid fold" (Dolinnaya y Fresco, 1992; Dolinnaya *et al.*, 1993; Ortiz-Lombardía *et al.*, 1995), "parallel-stranded duplex" (Lee, 1990), "antiparallel-stranded duplex" (Huertas *et al.*, 1993; Casasnovas *et al.*, 1993), "zinc-specific duplex" (Ortiz-Lombardía *et al.*, 1995) y "tetraplex composed of two hairpins" (Shiber *et al.*, 1996; Mukerji *et al.*, 1996). De forma análoga, también es conocido que otros motivos, tales como el motivo AT, también confieren un considerable polimorfismo conformacional al DNA (véase Vorlicková *et al.*, 1998 y referencias citadas en el mismo).

La formación de estos productos adicionales una vez finalizada la PCR puede ser espontánea. Eventualmente, la generación de estos productos adicionales se puede inducir

por el uso de condiciones experimentales específicas. Entre estas condiciones se encuentra (a) desnaturalizar los productos de amplificación mediante el uso de cualquier procedimiento físico, químico o biológico, tal como desnaturalización térmica, desnaturalización electroquímica mediante la aplicación de voltaje, el uso de agentes
5 desnaturalizantes (*e.g.* formamida, urea, EDTA) y enzimas, y (b) renaturalizarlos con posterioridad. Otras condiciones experimentales para inducir la formación de productos adicionales incluyen someter los productos de amplificación a cambios de temperatura, cambios en la concentración de sales, cambios en el pH y cambios en la concentración de iones divalentes (véase, por ejemplo, Dolinnaya y Fresco, 1992; revisión de Frank-
10 Kamenetskii y Mirkin, 1995; Noonberg *et al.*, 1995; Ortiz-Lombardía *et al.*, 1995; Vorlícková *et al.*, 1998).

Una vez generados los homodúplexes y los productos adicionales, se procede a identificar los productos de amplificación necesarios para determinar el genotipo de la muestra, *i.e.*, los homodúplexes y los PAD. Para identificarlos, se puede utilizar cualquier
15 sistema de identificación de ácidos nucleicos que al menos mantenga homodúplexes y PAD generados con anterioridad. Sin embargo, para aplicar el método reivindicado, es más útil utilizar un sistema que, además de mantener homodúplexes y PAD, también tenga la capacidad de inducir la generación de nuevos PAD.

En este sentido, la electroforesis de DNA en condiciones no desnaturalizantes es
20 un sistema idóneo para mantener homodúplexes y PAD, y generar nuevos PAD. Es conocido que la electroforesis no desnaturalizante es un medio muy sensible a los cambios conformacionales del DNA, lo que permite la separación e identificación de una gran variedad de conformaciones de DNA. Así, se sabe que los tríplexes permanecen intactos durante la electroforesis en geles de poliacrilamida que contengan iones
25 magnesio (Durland *et al.*, 1991). De forma similar, la electroforesis no desnaturalizante es uno de los sistemas utilizados para detectar la presencia de tetráplexes (Lee, 1990), "single-stranded acid fold" (Dolinnaya y Fresco, 1992; Dolinnaya *et al.*, 1993; Ortiz-Lombardía *et al.*, 1995), "parallel-stranded duplex" (Lee, 1990), "antiparallel-stranded duplex" (Huertas *et al.*, 1993; Casasnovas *et al.*, 1993), "zinc-specific duplex" (Ortiz-
30 Lombardía *et al.*, 1995) y "tetraplex composed of two hairpins" (Shiber *et al.*, 1996; Mukerji *et al.*, 1996), etc. Por tanto, la electroforesis no desnaturalizante permite mantener, además de los homodúplexes, productos adicionales generados durante o tras la amplificación.

Por otra parte, es conocido que la electroforesis en gel no desnaturizante también puede promover la formación de productos adicionales tales como tríplexes intermoleculares. Por ejemplo, la electroforesis no desnaturizante genera tríplexes cuando una cadena sencilla con alta tasa de migración alcanza a una banda (de menor tasa de migración) que contiene una cadena doble de ácido nucleico con una secuencia apropiada (captura en el gel) (Belotserkovskii y Johnston, 1996). Además, se ha descrito la formación de "double-hairpin tetraplex" cuando se utiliza una alta fuerza iónica durante la electroforesis no desnaturizante (Shiber *et al.*, 1996). De forma análoga, se sabe que la electroforesis no desnaturizante genera la aparición de bandas diferentes a las bandas de los alelos en ciertos marcadores microsatélites. Esas nuevas bandas se originan probablemente a partir de alteraciones de la curvatura de la doble hélice (Lareu *et al.*, 1998) o como consecuencia de la formación de "hairpin loop" en secuencias de DNA ricas en el motivo AT (Prinz *et al.*, 1996).

Además de mantener los homodúplexes y los PAD, y generar nuevos PAD, la electroforesis de DNA en condiciones no desnaturizantes posibilita la identificación de los homodúplexes y los PAD a través de su separación física por medio de la acción de un campo eléctrico. Una vez finalizada la electroforesis, se procede a visualizar las bandas generadas a través de cualquier medio que permita la detección del DNA, tal como tinción con nitrato de plata, bromuro de etidio, etc.

Sin embargo, no se pretende limitar la técnica de identificación únicamente a electroforesis no desnaturizante. Así, se puede utilizar cualquier otra técnica que permita identificar homodúplexes y PAD, tales como la espectrometría de masas, la cromatografía, la hibridación diferencial, la secuenciación por hibridación, etc.

Una vez identificados los homodúplexes y los PAD, se procede a deducir el genotipo de la muestra en base al método GEDAP.

B) BASE Y VENTAJAS DEL METODO GEDAP

La base y las ventajas del método propuesto se ponen de manifiesto a través de su comparación con los métodos convencionales de genotipado. Para establecer la comparación, se toma como ejemplo el genotipado de un locus polimórfico con dos alelos a partir de muestras diploides (figura 1).

La diferencia fundamental entre el método GEDAP y los métodos convencionales tiene que ver con los productos adicionales generados a partir de la amplificación. Así, los métodos convencionales se basan en determinar el genotipo de un locus polimórfico

considerando únicamente los alelos amplificados a partir de la muestra (figura 2). Cualquier otro producto adicional a los alelos es considerado como un resultado artefactual, por lo que su presencia se intenta eliminar o reducir (véase, por ejemplo, Perlín *et al.* 1994, Schlötterer, 1998). Por tanto, en condiciones óptimas, las muestras homocigóticas presentarán un solo alelo amplificado (figura 2, a y c), mientras que las muestras heterocigóticas presentarán dos alelos amplificados distintos (figura 2, b).

Por el contrario, el método GEDAP se basa en el genotipado de un locus polimórfico a partir del análisis conjunto de los homodúplexes y los PAD identificados (figura 3). Los PAD son considerados como una información adicional útil para confirmar el genotipo de la muestra, por lo que su presencia se intenta mantener e inducir. Los PAD útiles para el genotipado se pueden clasificar en dos tipos distintos: productos adicionales diagnósticos de genotipo (PAD-HOM y PAD-HET) y productos adicionales diagnósticos de alelo (PAD-AL). La presencia de estos dos tipos de PAD acentúa las diferencias existentes entre las muestras homocigóticas y las muestras heterocigóticas. Así, en condiciones óptimas, las muestras homocigóticas presentarán un solo homodúplex, al menos un PAD-HOM y al menos un PAD-AL específico del homodúplex identificado (figura 3, a y c). Por el contrario, las muestras heterocigóticas presentarán dos homodúplexes, al menos un PAD-HET y al menos un PAD-AL específico de cada uno de los homodúplexes identificados (figura 3, b).

El distinto planteamiento de los métodos convencionales de genotipado y del método GEDAP se traduce en una distinta capacidad para detectar y/o prevenir errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales. Así, los métodos convencionales no permiten discriminar entre muestras heterocigóticas con no-amplificación total (figura 4, b1) y muestras verdaderamente homocigóticas (figura 4, a), ya que ambas presentan un solo alelo amplificado. Por otra parte, las muestras heterocigóticas que presentan no-amplificación parcial (figura 4, b2) pueden ser confundidas con muestras homocigóticas (figura 4, a), especialmente si la cantidad del alelo hipoamplificado está por debajo del nivel umbral de detección. Por tanto, los métodos convencionales son ineficientes en ambos casos, tanto para detectar como para prevenir errores de genotipado.

Por el contrario, el método GEDAP permite detectar y/o prevenir errores de genotipado en ambos casos de forma eficiente. Por una parte, el método GEDAP sí permite discriminar entre muestras heterocigóticas con no-amplificación total y muestras verdaderamente homocigóticas. Esta propiedad se debe a que, aunque ambos tipos de

muestras poseen un solo homodúplex, existen diferencias entre ellas en cuanto a los PAD. Así, las muestras heterocigóticas con no-amplificación total no presentan PAD-HOM (figura 5, b1), mientras que las muestras verdaderamente homocigóticas sí presentan PAD-HOM (figura 5, a). Por otra parte, también evita la confusión entre muestras heterocigóticas con no-amplificación parcial y muestras verdaderamente homocigóticas. Esta propiedad se debe a que las muestras heterocigóticas con no-amplificación parcial pueden ser identificadas por la presencia de los PAD-AL específicos de dos homodúplexes y/o por la presencia de PAD-HET (figura 5, b2), estando ausentes ambos PAD en muestras verdaderamente homocigóticas (figura 5, a).

En definitiva, el método GEDAP permite detectar errores de genotipado por medio de la identificación de combinaciones anómalas de homodúplexes y PAD; también permite prevenir errores de genotipado por medio de la identificación de combinaciones esperadas de homodúplexes y PAD, específicas de cada genotipo. En ambos casos, el uso de PAD-HOM, PAD-HET y PAD-AL representa un nivel de control fundamental para determinar que el genotipo de una muestra es homocigoto o heterocigoto.

C) EFICIENCIA DEL METODO GEDAP

La eficiencia del método se puede determinar estadísticamente. Para ello se puede testar si las frecuencias genotípicas observadas en una muestra poblacional se desvían significativamente de las proporciones genotípicas esperadas bajo Hardy-Weinberg (HWP). La potencia estadística para detectar desviaciones significativas se ve incrementada notablemente cuando se utilizan tests estadísticos que concentran las desviaciones de las HWP en un único grado de libertad (Gomes et al., 1999) y se analiza un tamaño muestral elevado.

Este tipo de control estadístico es un medio muy potente para detectar errores de genotipado (Chakraborty *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 1999). La existencia significativa de errores de genotipado puede ser detectada como desviaciones de las HWP. En particular, las no-amplificaciones de uno de los alelos presentes en las muestras heterocigóticas causan una deficiencia de heterocigotos con respecto a las HWP. Por tanto, si se genotipa una amplia muestra poblacional y se determina que no existen desviaciones significativas con respecto a las HWP, se podría concluir que el método GEDAP es eficiente para detectar y/o prevenir errores de genotipado.

D) APLICACIONES DEL METODO GEDAP

A continuación se ilustran algunas de las aplicaciones del método GEDAP, por medio de dos ejemplos: el genotipado de marcadores microsatélites de naturaleza dinucleotídica y los análisis de paternidad. Estos ejemplos tan sólo son encarnaciones
5 ilustrativas de la presente invención y no pretenden limitar de ningún modo ni el alcance ni las aplicaciones de la misma. Por otra parte, es obvio que se pueden llevar a cabo modificaciones en los procedimientos que se describen a continuación sin que suponga una vulneración del espíritu de la invención recogido en las reivindicaciones.

10 EJEMPLO 1: DETECCION Y/O PREVENCIÓN DE ERRORES EN EL GENOTIPADO DE MICROSATELITES DE NATURALEZA DINUCLEOTIDICA

El siguiente ejemplo ilustra en detalle cómo utilizar el método GEDAP para detectar y/o prevenir errores en el genotipado de marcadores microsatélites de naturaleza dinucleotídica a partir de muestras de individuos humanos.

15

1.- MUESTRAS, EXTRACCION DEL DNA Y MARCADORES

Se analizaron 405 individuos no relacionados residentes en Galicia. El DNA se extrajo a partir de muestras de sangre de cada uno de los individuos mediante un kit comercial (QIAamp blood kit, QIAGEN). Todos los individuos se genotiparon para 6
20 marcadores microsatélites de naturaleza dinucleotídica localizados en el cromosoma 11 humano: D11S4177, D11S1323, D11S4124, D11S1318, D11S909 y D11S1760 (Dib *et al.*, 1996).

2.- AMPLIFICACION

25 Los alelos de cada marcador presentes en cada una de las muestras se amplificaron mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las secuencias de los primers específicos para amplificar cada locus fueron tomadas a partir de la base de datos Génethon (<http://www.genethon.fr>). Las amplificaciones se llevaron a cabo en mezclas de reacción que contenían 120 ng de DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1%
30 Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, Glicerol 10% (v/v), 50 picomoles de cada primer, 200 µM de dNTP mix y 1 U de *Taq* polimerasa, en un volumen final de 25 µl. Las amplificaciones se realizaron en termocicladores GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) y consistieron en 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 40 s) y primado (55°C, 30

s). Una vez finalizado el último ciclo, un paso adicional de extensión (72°C, 2 min) completó el proceso de amplificación.

3.- GENERACION DE HOMODUPLEXES Y PAD

5 Las condiciones térmicas utilizadas en la amplificación favorecieron la generación de homodúplexes y PAD. Asimismo, el sistema electroforético utilizado para detectar los homodúplexes y los PAD permitió mantener la presencia de homodúplexes y PAD e inducir la formación de nuevos PAD (véase apartado 5).

10 4.- DETECCION DE HOMODUPLEXES Y PAD

Los homodúplexes y los PAD generados a partir de los productos de amplificación de cada una de las muestras se separaron por medio de electroforesis no desnaturizante en geles ultrafinos de poliacrilamida utilizando un sistema de tampones discontinuo borato/formato.

15 Los geles de poliacrilamida se elaboraron con un grosor de 0,4 mm. Las dimensiones de los geles fueron 13,5 cm de anchura por 20 cm de longitud para los loci D11S1760 y D11S909, y 13,5 cm de anchura por 24 cm de longitud para el resto de los microsátélites analizados. El soporte utilizado para la polimerización de los geles fue vidrio sencillo de 2 mm de grosor tratado con *Bind Silane* (Pharmacia 17-1330-01). El
20 tamaño de poro de las mallas de poliacrilamida fue 7,7% T 6,3% C para los loci D11S1760 y D11S909, y 6,7% T 7,1% C para el resto de microsátélites analizados. La concentración total del monómero (% T) y la concentración del monómero *crosslinker* (% C) se definen como $\%T = [(a + b) / VT] 100$ $\%T = [a / (a + b)] 100$, siendo *a* y *b* los gramos de acrilamida y piperacina di-acrilamida, respectivamente y *VT* el volumen total de la solución del gel. El tampón del gel empleado fue una solución 0,33 M TRIS, 110
25 mM ácido fórmico, 24 mM ácido bórico y 6% glicerol v/v (pH = 9,0). Para la polimerización de la malla de poliacrilamida, se añadió persulfato amónico 2,5 mM y 1,6 µl de *TEMED* (Merck 1.10732) por mililitro de solución del gel. Acto seguido, los geles se mantuvieron a 37°C en oscuridad durante 20 minutos antes de ser utilizados en las
30 electroforesis.

El tampón electrolítico se aplicó al gel mediante dos tiras de papel secante (*Blotting Paper*, Sigma P-7176) de 1 cm de anchura empapadas en una solución 1 M TRIS y 0,28 M ácido bórico. Las tiras se dispusieron en los extremos del gel y sobre ellas se colocaron los electrodos. La distancia interelectrodo efectiva en los geles de 24 y 20

cm fue de 22 y 18 cm, respectivamente. Las soluciones con los productos de amplificación se cargaron directamente sobre el gel a 0,5 cm de distancia del cátodo. Para ello se utilizaron papeles de fibra de vidrio (*IEF sample appl. piece*, Pharmacia Biotech 80-1129-46) de 3,3 x 2,5 mm, impregnados con 3 µl de cada solución. El voltaje y el tiempo de recorrido utilizados para cada marcador variaron desde 600 V hasta 700 V y de 2h 30 min a 4 h, respectivamente (véase tabla adjunta). La intensidad y la potencia se mantuvieron constantes a 25 mA y 20 W. Las electroforesis se llevaron a cabo a una temperatura constante de 15°C en el sistema *Multiphor II* (LKB Pharmacia), utilizando azul de bromofenol como indicador de migración.

Condiciones electroforéticas utilizadas para resolver cada microsatélite.

Locus	D11S4177	D11S1323	D11S4124	D11S1318	D11S909	D11S1760
Voltaje	700 V	700 V	700 V	600 V	600 V	600 V
Tiempo	4 h	3h 40 min	3h 15 min	3h 15 min	2h 45 min	2h 30 min

Una vez finalizada cada electroforesis, los homodúplexes y los PAD se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito por Budowle *et al.* (1991).

Características del sistema electroforético:

El sistema electroforético utilizado para detectar los homodúplexes y los PAD tiene características muy ventajosas para reducir la probabilidad de errores de genotipado. Por una parte, permite mantener los homodúplexes y los PAD generados durante la PCR e inducir la formación de nuevos PAD, por lo que es útil para detectar y/o prevenir errores de genotipado mediante el método GEDAP. Por otra parte este sistema electroforético también permite separar los productos de amplificación de marcadores de naturaleza dinucleotídica con una resolución de un nucleótido y con gran precisión en la determinación del tamaño de los alelos. Por lo tanto, es útil para prevenir errores de genotipado debidos tanto a la ausencia de resolución de un nucleótido (Smith *et al.*, 1995; Schlötterer, 1998; Wenz *et al.*, 1998) como a la existencia de migraciones electroforéticas anormales entre los alelos de un locus (Kimpton *et al.*, 1995; Prinz *et al.*, 1996).

La resolución y la precisión del sistema electroforético se pone de manifiesto al representar gráficamente el tamaño de los alelos frente a su movilidad relativa, $R(f)$,

calculada como la relación entre la distancia de migración desde el extremo anódico del punto de inserción de cada muestra hasta la "homoduplex band" y la distancia desde el extremo anódico del punto de inserción hasta el límite catódico de migración. La figura 6 muestra la resolución y la precisión del sistema electroforético, bajo las condiciones
5 utilizadas para resolver los alelos de los seis microsatélites analizados. Las diferencias de $R(f)$ observadas entre las "homoduplex bands" con diferencias de tamaño de 2 pares de bases, son suficientemente grandes como para discriminar diferencias de un único par de bases. De hecho, este sistema electroforético permite detectar diferencias en tamaño de un único par de bases entre las "homoduplex bands" de un microsatélite de naturaleza
10 dinucleotídica (D11S1759) analizado en nuestro laboratorio (datos no mostrados).

En la figura 6 también se puede observar que este sistema electroforético también proporciona una alta precisión para determinar el tamaño de las "homoduplex bands" de microsatélites de naturaleza dinucleotídica. Debe ser recordado que las anomalías electroforéticas que provocan inexactitudes en la determinación del tamaño de los alelos
15 se caracterizan por la existencia de "mobility shifts", compresiones de bandas o migraciones anómalas de las bandas (Prinz *et al.*, 1996). Sin embargo, en la figura 6 se puede observar que no existe ninguna evidencia de este tipo de anomalías entre las "homoduplex bands" de los loci analizados.

Por otra parte, las condiciones electroforéticas fijadas en el sistema electroforético
20 (condiciones no desnaturizantes, alta fuerza iónica, temperatura adecuada, etc.) permiten mantener e inducir la presencia de homodúplexes y PAD (figura 7, a). En este sentido, hay que destacar que las condiciones electroforéticas inciden decisivamente en la detección de PAD. La figura 7, b muestra cómo el uso de condiciones desnaturizantes y el empleo de una temperatura de recorrido de 50°C provocan que únicamente se detecten
25 las bandas de los alelos. Este hecho es fácilmente explicable teniendo en cuenta que los PAD son el resultado de la formación de complejos y/o de cambios conformacionales de los productos de amplificación, y que el uso de condiciones desnaturizantes y una alta temperatura evitan la hibridación de dos o más cadenas de ácidos nucleicos. Debe ser recordado que ésta es la aproximación seguida por los métodos convencionales de
30 genotipado y que la presente invención se basa en lo contrario, es decir, en estimular la formación de complejos y cambios conformacionales para generar PAD.

5.- IDENTIFICACION DE HOMODUPLEXES, PAD-AL, PAD-HOM, Y PAD-HET

Los homodúplexes y los PAD se identificaron a partir de los patrones de bandas visualizados en los geles (figura 8).

5.1.- IDENTIFICACION DE HOMODUPLEXES Y PAD-AL

Por una parte, este sistema electroforético permitió la identificación de los homodúplexes y de los PAD-AL a partir de la visualización de tres tipos de bandas: "homoduplex bands", "Diagnostic Shadow Bands" (DSBs) y "stutter bands" (figura 8). Estos tres tipos de bandas son útiles para determinar qué alelo o alelos se han amplificado a partir de cada una de las muestras analizadas.

Cada "homoduplex band" se forma a partir de cada uno de los homodúplexes generados a partir de los alelos amplificados. Las "homoduplex bands" se pueden diferenciar del resto de las bandas porque generalmente tienen asociada una DSB y al menos una "stutter band".

Las "stutter bands" se forman a partir de los PAD-AL que se generan debido a la existencia de errores en la amplificación de los alelos (concretamente debido al "slippage" de la *Taq* polimerasa). En este sistema electroforético se visualizaron generalmente como una única banda con una migración relativa dos pares de bases superior a la migración de su correspondiente "homoduplex band". Cuando se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata, las "stutter bands" presentaron una intensidad menor que la intensidad de sus correspondientes "homoduplex bands".

Cada DSB se forma a partir de un PAD-AL como consecuencia de un cambio conformacional de un homodúplex. Las DSBs son fácilmente diferenciables del resto de bandas porque tienen una migración relativa menor que la de sus correspondientes "homoduplex bands". Además, la distancia "homoduplex band" - DSB es prácticamente constante dentro de cada locus. Asimismo, debe hacerse notar que la distancia "homoduplex band" - DSB varía entre loci (aproximadamente 4 pares de bases en D11S1760; 6 pb en D11S909; 8 pb en D11S4177, D11S4124, y D11S1318; y 14 pb en D11S1323).

30

5.2.- IDENTIFICACION DE PAD-HOM Y PAD-HET

Por otra parte, este sistema electroforético también permitió la identificación de los PAD-HOM y de los PAD-HET, a partir de la visualización de dos tipos de bandas: "faint bands" y "heteroduplex bands" (figura 8). Estos dos tipos de bandas son útiles para

determinar si la muestra analizada es homocigótica o es heterocigótica para un microsatélite dado, de naturaleza dinucleotídica.

Las "heteroduplex bands" se forman a partir de PAD-HET. Las "heteroduplex bands" son fácilmente diferenciables del resto de bandas porque la distancia
5 "homoduplex band" - "heteroduplex band" es superior a la distancia "homoduplex band" - DSB.

Las "faint bands" se forman a partir de PAD-HOM. Las "faint bands" son fácilmente diferenciables del resto de bandas porque la distancia "homoduplex band" -
"faint band" es superior a la distancia "homoduplex band" - DSB. Asimismo, la distancia
10 "homoduplex band" - "faint band" es generalmente inferior a la distancia "homoduplex band" - "heteroduplex band".

6.- DETECCION Y/O PREVENCIÓN DE ERRORES DE GENOTIPADO

El método GEDAP nos permitió detectar y/o prevenir un número relativamente
15 elevado de errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales. Para ello, se utilizaron dos estrategias distintas: una estrategia para detectar errores de genotipado y una estrategia para prevenir errores de genotipado. Ambas estrategias se basaron en el análisis conjunto de las bandas descritas en el apartado anterior. A continuación se muestra cómo se aplicaron estas dos estrategias para genotipar los seis
20 microsatélites de naturaleza dinucleotídica. La eficiencia del método se evaluará posteriormente (ver apartado 7).

6.1.- DETECCIÓN DE ERRORES DE GENOTIPADO

El método GEDAP nos permitió detectar errores de genotipado debidos a no-
25 amplificaciones totales o parciales. Los errores de genotipado se detectaron a partir de muestras con patrones de bandas anómalos. Fueron considerados patrones de bandas anómalos:

- (a) aquellos patrones de bandas con una única "homoduplex band" y ninguna
"faint band" (figura 9, B). Compárese con el patrón de bandas esperado
30 específico de un genotipo homocigoto (figura 9, A).
- (b) aquellos patrones de bandas con una única "homoduplex band" y al menos una
"heteroduplex band" (figura 9, C). Compárese con el patrón de bandas
esperado específico de un genotipo heterocigoto (figura 9, D).

Para detectar errores de genotipado, analizamos los patrones de bandas de los 405 individuos no relacionados (un tamaño muestral lo suficientemente grande como para detectar la posible ocurrencia de errores de genotipado) y realizamos réplicas de todas las muestras aparentemente homocigóticas que carecían de "faint bands" o que presentaban
5 al menos una "heteroduplex band" en sus correspondientes patrones de bandas. Las réplicas se realizaron hasta que se observó claramente la presencia de las "faint bands" o la presencia de un patrón de bandas correspondiente a un genotipo heterocigoto.

Los resultados obtenidos a partir de las réplicas confirmaron, por una parte, que un elevado porcentaje de las muestras aparentemente homocigóticas que carecían de "faint
10 bands" en sus patrones de bandas eran en realidad muestras heterocigóticas, en las que había habido una no-amplificación total de uno de sus dos alelos. Por lo tanto, el método GEDAP es útil para detectar errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales. La tasa de errores de genotipado detectados por medio de esta estrategia varió entre un 0% (D11S1323 y D11S1760) y un 2% (D11S909). Los errores de genotipado detectados
15 afectaron a distintos individuos en cada uno de los loci: individuos 37, 39, 57, 62, 263, 351 y 398 (D11S4177); individuos 104, 311 y 400 (D11S4124); individuo 134 (D11S1318); e individuos 48, 80, 216, 281 y 289 (D11S909). Al considerar los seis loci, el porcentaje de errores de genotipado detectados fue del 5% (19/405). Es importante subrayar que el porcentaje de genotipos multiloci tipados erróneamente puede verse
20 notablemente incrementado en estudios en los que se requiere analizar un gran número de marcadores (*e.g.* en el caso de los "genome scans").

Por otra parte, los resultados obtenidos a partir de las réplicas también confirmaron que las muestras aparentemente homocigóticas que presentaban al menos una "heteroduplex band" en sus patrones de bandas eran en realidad muestras
25 heterocigóticas en las que había habido no-amplificación total o parcial de uno de sus dos alelos. Por lo tanto, el método GEDAP también es útil para detectar errores de genotipado debidos a no-amplificaciones parciales.

6.2.- PREVENCIÓN DE ERRORES DE GENOTIPADO

30 El método GEDAP también nos permitió prevenir errores de genotipado. Para ello se utilizaron dos aproximaciones distintas: una aproximación para prevenir errores en el genotipado de muestras heterocigóticas y una aproximación para prevenir errores en el genotipado de muestras homocigóticas.

6.2.1.- Prevención de errores en el genotipado de muestras heterocigóticas

La aproximación utilizada para prevenir errores en el genotipado de muestras heterocigóticas consistió en asignar un genotipo heterocigoto a una muestra, únicamente cuando el sistema electroforético generó un patrón de bandas en el que se detectaron dos

5 “homoduplex bands” y:

(a) al menos una “heteroduplex band”; y/o

(b) al menos una DSB asociada con cada una de las “homoduplex bands” y/o

(c) al menos una “stutter band” asociada con cada una de las “homoduplex bands”.

La reproducción de los patrones de bandas de muestras heterocigóticas a partir de la
10 mezcla de los DNAs de muestras homocigóticas antes de la PCR y el análisis de los patrones de bandas de los 405 individuos no relacionados, nos permitieron confirmar que la presencia de las bandas mencionadas en el párrafo anterior es suficiente para determinar que el genotipo de una muestra es heterocigoto. Por otra parte, el uso de esta aproximación nos permitió prevenir un número relativamente elevado de errores de
15 genotipado debidos a no-amplificaciones parciales. A continuación se describen en detalle los datos experimentales que confirman ambas aseveraciones.

En la figura 10 se ilustra cómo se pueden prevenir errores en el genotipado de muestras heterocigóticas debidos a no-amplificaciones parciales, en base al análisis conjunto de las bandas generadas por el sistema electroforético. En concreto, se muestra
20 el patrón de bandas del genotipo heterocigoto para los alelos 90 y 84 del locus D11S1760 en ausencia (figura 10, B) y en presencia (figura 10, A y C) de no-amplificación parcial. El patrón de bandas de dicho genotipo se reprodujo mediante PCR bajo condiciones inductoras de no-amplificación parcial (figura 10, A y C). Dichas condiciones consistieron en mezclar de los DNAs de dos individuos heterocigotos en proporciones
25 desiguales y realizar la amplificación a partir de los DNAs mezclados.

Los resultados obtenidos, tras inducir la no-amplificación parcial de uno de los dos alelos del genotipo heterocigoto, evidenciaron una diferencia sustancial en la intensidad de las “homoduplex bands” generadas a partir de los dos alelos (figura 10 , A y C). Atendiendo únicamente a las “homoduplex bands” (hecho en el que se basan los métodos
30 convencionales de genotipado), la diferencia en la intensidad de ambas bandas podría provocar un error de genotipado. Sin embargo, el método GEDAP permite prevenir esos errores de genotipado. Ello se debe a que tanto las “heteroduplex bands” específicas del genotipo 90/84, como las DSBs y las “stutter bands” asociadas con las “homoduplex bands” generadas a partir de los alelos 90 y 84, están presentes en los patrones de bandas

obtenidos tras inducir la no-amplificación parcial de cada uno de los alelos de este genotipo. Por tanto, esas bandas son útiles para prevenir errores en el genotipado de muestras heterocigóticas debidos a no-amplificación parcial.

El uso de esta aproximación en el análisis de la muestra de 405 individuos no relacionados nos permitió prevenir errores de genotipado debidos a la no-amplificación parcial de uno de los alelos, en un número relativamente elevado de muestras heterocigóticas. Por ejemplo, en muestras heterocigóticas para el locus D11S4177 que presentaron el alelo 183 y otro alelo de mayor tamaño, el alelo 183 mostró frecuentemente una amplificación preferencial con respecto a los alelos de mayor tamaño. De forma análoga, se han podido prevenir errores de genotipado debidos a no-amplificaciones parciales en muestras heterocigóticas para alelos con menores diferencias en tamaño, en los seis loci analizados. Por lo tanto, el método GEDAP es útil para prevenir errores de genotipado debidos a no-amplificaciones parciales.

Sin embargo, es importante destacar que la aproximación utilizada por el método GEDAP para genotipar muestras heterocigóticas no debe ser utilizada para genotipar muestras homocigóticas. Es decir, la ausencia de "heteroduplex bands" y/o dos "stutter bands" y/o dos DSBs correspondientes a dos "homoduplex bands" no es suficiente para establecer que el genotipo de una muestra es homocigoto. Por el contrario, genotipar microsatélites de naturaleza dinucleotídica teniendo en cuenta únicamente la estrategia de genotipado de muestras heterocigóticas puede incrementar la tasa de errores de genotipado porque, como se ha demostrado con anterioridad, los patrones de bandas de muestras heterocigóticas carecen de "heteroduplex bands" cuando existe no-amplificación total. Por tanto, es necesario el uso de una aproximación distinta para prevenir errores en el genotipado de muestras homocigóticas.

25

6.2.2.- Prevención de errores en el genotipado de muestras homocigóticas

La aproximación utilizada por el método GEDAP para prevenir errores en el genotipado de muestras homocigóticas consistió en asignar un genotipo homocigoto a una muestra únicamente cuando el sistema electroforético generó un patrón de bandas en el que se detectaron una única "homoduplex band" y al menos una "faint band".

30

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los patrones de bandas de los individuos relacionados y no relacionados mostraron que las "faint bands" siempre aparecen en patrones de bandas en los que se detecta una única "homoduplex band", a excepción de los patrones de bandas de muestras heterocigóticas en las que existe no-

amplificación total de uno de los alelos (ver apartado 6.1). Por lo tanto, la presencia de las "faint bands" representa un nivel adicional de control para prevenir errores de genotipado consistentes en asignar un genotipo homocigoto a muestras que en realidad son heterocigóticas.

5

7.- EFICIENCIA DEL METODO GEDAP

La eficiencia se determinó estadísticamente testando si las frecuencias genotípicas observadas en la muestra de 405 individuos no relacionados se desvían significativamente de las proporciones genotípicas esperadas bajo Hardy-Weinberg (HWP).

10

Las desviaciones de las HWP para cada locus y para cada alelo y su significación se estimaron siguiendo el procedimiento y los estadísticos descritos por Robertson y Hill (1984). Los resultados obtenidos mostraron que las frecuencias genotípicas observadas concuerdan con las frecuencias genotípicas esperadas en cada uno de los loci, no detectándose ninguna desviación significativa de las HWP (ver tabla adjunta).

15

Desviaciones de las HWP para cada locus (f_T) y su significación (X^2).

Locus	Het. Obs.	Het. Esp. ^a	$f_T \pm S.E.$	X^2 (g.l. = 1)
D11S4177	0.795	0.788	0.005 ± 0.020	0.12
D11S1323	0.625	0.617	0.001 ± 0.018	0.01
D11S4124	0.723	0.710	0.001 ± 0.018	0.00
D11S1318	0.817	0.805	-0.001 ± 0.011	0.01
D11S909	0.723	0.738	0.024 ± 0.039	2.51
D11S1760	0.807	0.782	-0.015 ± 0.000	1.03

^a La heterocigosis esperada insesgada se calculó por medio de la ecuación

$$h = 2n \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) / 2n - 1 \quad (\text{Nei y Roychoudhury, 1974}).$$

25

Por otra parte, sólo uno de los 68 alelos observados se desvió significativamente de las HWP (datos no mostrados). Esta desviación significativa se puede explicar simplemente por la existencia de un error de tipo I, por lo que las frecuencias genotípicas observadas para cada alelo también son consistentes con las HWP. Además, las desviaciones detectadas mediante el estadístico f fueron pequeñas y no sistemáticas. En conclusión, no existen evidencias de una presencia significativa de no-amplificaciones

30

que conduzcan al genotipado de muestras heterocigóticas como homocigóticas. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante este análisis confirman que el método GEDAP es eficiente para detectar y/o prevenir errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales.

5

EJEMPLO 2: ANALISIS DE PATERNIDAD

En el siguiente ejemplo se ilustra la utilidad del método GEDAP para identificar individuos humanos de forma precisa. En concreto, se muestra cómo permite la prevención de falsas exclusiones de parentesco.

10 Esta aplicación se pone en evidencia a partir del genotipado, en individuos caucasoides relacionados biológicamente, de los seis microsátélites de naturaleza dinucleotídica utilizados en el ejemplo 1.

La extracción del DNA de los individuos relacionados, la amplificación de los marcadores y la generación, detección e identificación de los homodúplexes y PAD se
15 realizaron de acuerdo con los apartados 1, 2, 3, 4 y 5 del ejemplo 1.

La figura 11 muestra un resultado no mendeliano para el marcador D11S1760. En base a los métodos convencionales de genotipado (es decir, atendiendo únicamente a las "homoduplex bands" generadas a partir de los alelos en cada uno de los individuos), se podría concluir que dos de los hijos del individuo A (individuos B y C), no son hijos
20 biológicos de dicho individuo. En concreto, el individuo A sólo presentó una "homoduplex band" (generada a partir del alelo 84) y sus correspondientes bandas asociadas: una DSB y una "stutter band". Por tanto, los métodos convencionales de genotipado determinarían que el genotipo de este individuo es homocigoto 84/84. De ser éste el genotipo real del individuo A, este individuo debería transmitir necesariamente un
25 alelo 84 a cada uno de sus hijos. Sin embargo, los individuos B y C no evidenciaron en su patrón de bandas ninguna "homoduplex band" generada a partir del alelo 84. Por el contrario, ambos presentaron el patrón de bandas característico de un genotipo 94/90, es decir, dos "homoduplex bands" (generadas a partir de los alelos 94 y 90, respectivamente), las correspondientes DSBs y "stutter bands" asociadas con ambas
30 "homoduplex bands", y tres "heteroduplex bands" características del genotipo 94/90.

Sin embargo, el método GEDAP permitió descartar esta posible exclusión de parentesco y demostrar que el aparente resultado no mendeliano era debido en realidad a ocurrencia de no-amplificación total de un alelo en el individuo A. En concreto, el análisis del patrón de bandas del individuo A mediante el método GEDAP evidencia que

dicho patrón es un patrón de bandas anómalo en el que se detecta una única "homoduplex band" y no se detecta ninguna "faint band" (figura 11, A. Compárese con los patrones de bandas de las muestras D y 54, que sí presentaron las "faint bands" específicas del genotipo 84/84). Como se demostró en el ejemplo 1, la presencia de este patrón de bandas
5 anómalo es un fuerte indicativo de no-amplificación total. Para testar esta posibilidad, realizamos tres réplicas de cada uno de los miembros de esta familia (figura 12). Las tres réplicas confirmaron que el aparente problema de parentesco detectado inicialmente era en realidad un error de genotipado del individuo A debido a la no-amplificación total del alelo 90. Este hecho se vio confirmado con el análisis de los 5 marcadores restantes
10 analizados.

Por lo tanto, el método GEDAP es útil para detectar y prevenir eficientemente falsas exclusiones de parentesco. De hecho, el método GEDAP también permitió descartar una nueva aparente exclusión de paternidad observada a partir de dos de las réplicas del individuo B (B2 y B3, figura 12). En ambas réplicas, los patrones de bandas
15 generados a partir de este individuo sólo presentaron el homodúplex correspondiente al alelo 94 (ausente en la madre). Sin embargo, ambos patrones también fueron anómalos (ya que no se detectaron "faint bands"), por lo que, al igual que en el caso anterior, el método GEDAP también permitió determinar que esas aparentes falsas exclusiones son en realidad el resultado de la no-amplificación total del alelo 90.

20

BIBLIOGRAFIA

- Akey, J. M., Zhang, K., Xiong, M., Doris, P. *et al.* (2001) *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 1447-1456.
- Anderson, T. J. C., Paul, R. E. L., Donnelly, C. A., Day, K. P. (2000) *Genet. Res.* **75**: 285-
25 296.
- Applied Biosystems. (2001) *Biosystems Solutions* 1: 10.
- Ardren, W. R., Borer, S., Thrower, F., Joyce, J. E. *et al.* (1999) *J. Hered.* **90**: 529-536.
- Beauche *et al.* (1981) *Tetrahedron Letters* **22**: 1859-1862.
- Belotserkovskii, B. P., Johnston, B. H. (1996) *Electrophoresis* **17**: 1528-1534.
- 30 Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A. M., Eisenberg, A. J. *et al.* (1991) *Am. J. Hum. Genet.* **48**: 137-144.
- Buetow, K. H. (1991) *Am. J. Hum. Genet.* **49**: 985-994.
- Caruthers, M. H., Barone, A. D., Beauche, S. L., Dodds, D. R. *et al.* (1988) *Methods Enzymol.* **154**: 287-314.

- Casasnovas, J. M., Huertas, D., Ortiz-Lombardía, M., Kypr, J. *et al.* (1993) *J. Mol. Biol.* **233**: 671-681.
- Chakraborty, R., de Andrade, M., Daiger, S. P., Budowle, B. (1992) *Ann. Hum. Genet.* **56**: 45-57.
- 5 de La Chapelle, A., Wright, F. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12416-12423.
- Deka, R., de Croo, S., Yu, L. M., Ferrell, R. E. (1992) *Hum. Genet.* **90**: 86-90.
- Demers, D. B., Curry, E. T., Egholm, M., Sozer, A. C. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**: 3050-3055.
- Dib, C., Fauré, S., Fizames, C., Samson, D. *et al.* (1996) *Nature* **380**: 152-154.
- 10 Dolinnaya, N. G., Braswell, E. H., Fossella, J. A., Klump, H. *et al.* (1993) *Biochemistry* **32**: 10263-10270.
- Dolinnaya, N. G., Fresco, J. R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9242-9246.
- Douglas, J. A., Boehnke, M., Lange, K. (2000) *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 1287-1297.
- Dr bek, J. (2001) *Electrophoresis* **22**: 1024-1045.
- 15 Durland, R. H., Kessler, D. J., Gunell, S., Duvic, M. *et al.* (1991) *Biochemistry* **30**: 9246-9255.
- Ewen, K. R., Bahlo, M., Treloar, S. A., Levinson, D. F. *et al.* (2000) *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 727-736.
- Findlay, I., Ray, P., Quirke, P., Rutherford, A. *et al.* (1995) *Hum. Reprod.* **10**: 1609-1618.
- 20 Fishback, A. G., Danzmann, R. G., Sakamoto, T., Ferguson, M. M. (1999) *Aquaculture* **172**: 247-254.
- Frank-Kamenetskii, M. D., Mirkin, S. M. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 65-95.
- Gagneux, P., Boesch, C., Woodruff, D. (1997) *Mol. Ecol.* **6**: 861-868.
- Gaillard, C., Strauss, F. (1994) *Science* **264**: 433-436.
- 25 Garvin, A. M., Holzgreve, W., Hahn, S. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**: 3468-3472.
- Goldstein, D. R., Zhao, H., Speed, T. P. (1997). *Hum Hered.* **47**: 86-100.
- Gomes, I., Collins, A., Lonjou, C., Thomas, N. S. *et al.* (1999) *Ann. Hum. Genet.* **63**: 535-538.
- Göring, H. H. H., Terwilliger J. D., Ott, J. (1997) *Am. J. Hum. Genet.* **61**: 1614.
- 30 Göring, H. H. H., Terwilliger, J. D. (2000) *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 1107-1118.
- Haddad, L. A., Fuzikawa, A. K., Pena, S. D. J. (1997) *Hum. Genet.* **99**: 796-800.
- Handyside, A. H., Delhanty, J. D. A. (1997) *Trends Genet.* **13**: 270-275.
- Haralambidis, J., Duncan, L., Angus, K., Treagear, G. W. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**: 1055-1067.

- Harper, J. C., Coonen, E., Handyside, A. H. *et al.* (1995) *Prenat. Diagn.* **15**: 41-49.
- Huertas, D., Bellsollé, L., Casasnovas, J. M., Coll, M. *et al.* (1993) *EMBO J.* **12**: 4029-4038.
- Kimpton, C. P., Gill, P., d'Aloja, E., Andersen, J. F. *et al.* (1995) *Forensic Sci. Int.* **71**: 137-152.
- Lareu, V., Pestoni, C., Phillips, C., Barros, F. *et al.* (1998) *Electrophoresis* **19**: 1566-1572.
- Lee, J. S. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**: 6057-6060.
- Lissens, W., Sermon, K. (1997) *Hum. Reprod.* **12**: 1756-1761.
- Miller, M. J., Yuan, B. Z. (1997) *Anal. Biochem.* **251**: 50-56.
- Mukerji, I., Shiber, M. C., Fresco, J. R., Spiro, T. G. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**: 5013-5020.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. *et al.* (1986) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **51 Pt 1**: 263-273.
- Mutter, G. L., Boynton, K. A. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**: 1411-1418.
- Nei, M., Rychoudhury, A. K. (1974) *Genetics* **76**: 379-390.
- Neilan, B. A., Leigh, D. A., Rapley, E., McDonald, B. L. (1994) *BioTechniques* **17**: 708, 710, 712.
- Noonberg, S. B., François, J. C., Garestier, T., Hélène, C. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**: 1956-1963.
- Ortiz-Lombardía, M., Eritja, R., Azorín, F., Kypr, J. *et al.* (1995) *Biochemistry* **34**: 14408-14415.
- Pemberton, J. M., Slate, J., Bancroft, D. R., Barrett, J. A. (1995) *Mol. Ecol.* **4**: 249-252.
- Perlin, M. W., Burks, M. B., Hoop, R. C. Hoffman, E. P. (1994) *Am. J. Hum. Genet.* **55**: 777-787.
- Prinz, M., Schmitt, C., Staak, M., Baum, H. (1996) *Electrophoresis* **17**: 1190-1193.
- Ray, P. F., Handyside, A. H. (1996) *Mol. Hum. Reprod.* **2**: 213-218.
- Robertson, A., Hill, W. G. (1984) *Genetics* **107**: 703-718.
- Ronai, Z., Guttman, A., Nemoda, Z., Staub, M. *et al.* (2000) *Electrophoresis* **21**: 2058-2061.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B. *et al.* (1985) *Science* **230**: 1350-1354.
- Schlotterer, C. (1998) Microsatellites, pp. 237-261. En: A.R. Hoelzel (Ed.), Oxford University Press.

- Shiber, M. C., Braswell, E. H., Khump, H., Fresco, J. R. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**: 5004-5012.
- Smith, J. R., Carpten, J. D., Brownstein, M. J., Ghosh, S. *et al.* (1995) *Genome Res.* **5**: 312-317.
- 5 Szibor, R., Plate, I., Krause, D. (1996) *Adv. Forensic Haemogenet.* **6**: 346-348.
- Taberlet, P. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**: 967.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S. *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**: 3189-3194.
- Terwilliger, J. D., Shannon, W. D., Lathrop, G. M., Nolan, J. P. *et al.* (1997) *Am. J. Hum.*
10 *Genet.* **61**: 430-438.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000) *Genome Res.* **10**: 967-981.
- Vorlícková, M., Kejnovská, I., Kovanda, J., Kypr, J. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**: 1509-1514.
- Walsh, P. S., Erlich, H. A., Higuchi, R. (1992) *PCR Methods Appl.* **1**: 241-250.
- 15 Weeks, D. E., Conley, Y. P., Mah, T. S., Otis Paul, T. *et al.* (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**: 1329-1349.
- Weissensteiner, T. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**: 966.
- Weissensteiner, T., Lanchbury, J. S. (1996) *BioTechniques* **21**: 1102-1108.
- Wenz, H., Robertson, J. M., Menchen, S., Oaks, F. *et al.* (1998) *Genome Res.* **8**: 69-80.
- 20 Wilkin, D. J., Koprivnikar, K. E., Cohn, D. H. (1993) *Genomics* **15**: 372-375.
- Yue, P. K., Kricka, L. J., Fortina, P., Panaro, N. J. *et al.* (2001) *Genome Res.* **11**: 405-412.
- Zapata, C., Rodríguez, S., Visedo, G., Sacristán, F. (2001a) *Genetics* **158**: (en prensa)
- Zapata, C., Carollo, C., Rodríguez, S. (2001b) *Ann. Hum. Genet.* **65**: (en prensa)

REIVINDICACIONES

1.- Método GEDAP (Genotyping Based on Diagnostic Amplification Products) para detectar y/o prevenir errores de genotipado a partir de los productos de amplificación de un locus polimórfico. El método comprende las siguientes etapas:

- 5 (a) amplificar una secuencia de ácido nucleico procedente de una o más células eucariotas
- (b) realizar la amplificación bajo condiciones que induzcan la generación de:
 - (b.1) homodúplexes de los alelos amplificados (abreviadamente homodúplexes)
 - 10 (b.2) otros Productos Adicionales con valor Diagnóstico (abreviadamente PAD)
- (c) someter los productos de amplificación a condiciones que favorezcan:
 - (c.1) mantener los homodúplexes y los PAD generados y, en su caso, la generación de nuevos PAD
 - 15 (c.2) detectar los homodúplexes y los PAD
- (d) realizar el genotipado a partir del análisis conjunto de los homodúplexes y los PAD

2.- Método, según la reivindicación 1, donde: Locus significa una secuencia de ácido nucleico que ocupa una posición concreta en un cromosoma. Locus polimórfico
20 significa cualquier locus que exhiba al menos dos alelos diferentes. Alelos son las secuencias de un locus para los distintos cromosomas homólogos de una célula eucariota. Alelos diferentes significa cualquier rasgo o característica de la secuencia que los diferencie, lo que incluye la sustitución, adición, delección o modificación de al menos un nucleótido. Célula eucariota es una célula con núcleo con una dotación cromosómica
25 diploide o poliploide. Genotipado significa determinar los alelos de la muestra para un locus dado. Por muestra se entenderá cualquier cantidad de ácido nucleico procedente de una o más células eucariotas.

3.- Método, según la reivindicación 1, donde: Amplificar significa incrementar el número de copias de al menos uno de los alelos del locus de interés por cualquier
30 procedimiento, tal como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Donde: Productos de amplificación son los productos generados al amplificar los alelos de la muestra. Donde: Errores de genotipado son los errores en la determinación del genotipo de una muestra provocados por no-amplificaciones totales o parciales. Por no-amplificación total o parcial se entenderá la ausencia total o parcial, respectivamente, del

producto de amplificación de al menos uno de los alelos. En la no-amplificación total o parcial se incluyen la amplificación preferencial, el “allele dropout” y los alelos nulos.

4.- Método, según la reivindicación 1, etapa (a), donde: Ácido nucleico significa un fragmento de DNA o RNA con una longitud mínima de un nucleótido. Se incluye
5 también cualquier fragmento de DNA que se obtenga mediante la retrotranscripción del RNA resultado de la expresión de los alelos del locus de interés.

5.- Método, según la reivindicación 1, etapa (b), donde: Realizar la amplificación bajo condiciones que induzcan la generación de homodúplexes y PAD incluye cualquier
10 procedimiento de amplificación que permita la desnaturalización de ácidos nucleicos de doble cadena y su posterior renaturalización. Se incluye también la amplificación bajo condiciones que no induzcan la generación de homodúplexes y PAD siempre que, posteriormente, se sometan los productos de amplificación a condiciones que sí induzcan su generación.

6.- Método, según la reivindicación 1, etapa (c), donde: Mantener los
15 homodúplexes y los PAD generados incluye las condiciones no desnaturalizantes o nativas. Donde: Someter los productos de amplificación a condiciones que favorezcan, en su caso, la generación de nuevos PAD, incluye (a) desnaturalizar los productos de amplificación mediante el uso de cualquier procedimiento físico, químico o biológico, tal como desnaturalización térmica, desnaturalización electroquímica mediante la aplicación
20 de voltaje, el uso de agentes desnaturalizantes (e.g. formamida, urea, EDTA) y enzimas y (b) renaturalizarlos con posterioridad. También se incluyen otras condiciones experimentales que favorezcan la formación de productos adicionales, tales como cambios en la temperatura, cambios en la concentración de sales, cambios en el pH y cambios en la concentración de iones divalentes. Donde: Detectar los homodúplexes y los
25 PAD, es a través de la utilización de cualquier procedimiento técnico tal como la electroforesis no desnaturalizante, la espectrometría de masas, la cromatografía, la hibridación diferencial, la secuenciación por hibridación, etc.

7.- Método, según la reivindicación 1, etapa (d), donde: Realizar el genotipado a partir del análisis conjunto de los homodúplexes y los PAD significa cualquier
30 procedimiento manual o cualquier procedimiento mecánico que permita determinar el genotipo de la muestra en base al estudio de los homodúplexes y los PAD presentes o ausentes. En cualquier procedimiento mecánico se incluye el uso de cualquier tipo de soporte o programa informático.

8.- Método, según las reivindicaciones 1 etapa (b.1) y 5, donde: Homodúplex del alelo amplificado (abreviadamente homodúplex) es un ácido nucleico constituido por dos cadenas totalmente complementarias correspondientes al mismo alelo amplificado. Homodúplexes de los alelos amplificados (abreviadamente homodúplexes), son los
5 productos de amplificación que, cuando se resuelven por electroforesis no desnaturizante, generan las "homoduplex bands"

9.- Método, según las reivindicaciones 1 etapa (b.2) y 5, donde: Productos Adicionales incluyen todos aquellos productos de amplificación que son diferentes a los homodúplexes generados a partir de los alelos de la muestra. Específicamente, son
10 Productos Adicionales:

- (a) cualquier ácido nucleico de cadena sencilla con una secuencia distinta a las secuencias de las cadenas de los alelos amplificados a partir de la muestra
- (b) cualquier ácido nucleico de doble cadena con una secuencia distinta a las secuencias de los homodúplexes generados a partir de los alelos de la muestra
- 15 (c) cualquier ácido nucleico de doble cadena constituido por cadenas no totalmente complementarias
- (d) cualquier producto de amplificación que resulte de la interacción entre al menos una cadena sencilla generada durante la amplificación y al menos un componente de la mezcla de reacción utilizada para la amplificación
- 20 (e) cualquier producto de amplificación que resulte de la interacción entre al menos una cadena sencilla generada durante la amplificación y al menos un componente del sistema utilizado para la detección de los productos de amplificación
- (f) cualquier producto de amplificación resultado de la hibridación de tres o más
25 cadenas generadas durante la amplificación
- (g) cualquier cambio conformacional de cualquiera de los homodúplexes
- (h) cualquier cambio conformacional de cualquiera de los productos adicionales
- (i) cualquier producto de amplificación que resulte de la interacción entre al menos un homodúplex y al menos un Producto Adicional
- 30 (j) cualquier producto de amplificación que resulte de la interacción entre al menos dos homodúplexes
- (k) cualquier producto de amplificación que resulte de la interacción entre al menos dos Productos Adicionales.

10.- Método, según la reivindicación 1 y 9, donde: En Productos Adicionales están incluidos los productos de amplificación de los loci microsatélites de naturaleza dinucleotídica que, cuando se separan por medio de electroforesis no desnaturizante, generan las bandas menores del patrón de bandas. Por patrón de bandas se entenderá el conjunto de bandas que se origina cuando se separan los productos de amplificación por medio de electroforesis no desnaturizante. Bandas menores son las bandas distintas a las "homoduplex bands", entre las que están incluidas las "stutter bands", las "diagnostic shadow bands", las "faint bands" y las "heteroduplex bands".

11.- Método, según las reivindicaciones 1, 6 y 7, donde: Productos Adicionales con valor Diagnóstico (PAD) incluyen los Productos Adicionales característicos o específicos (a) de los homocigotos (abreviadamente PAD-HOM), (b) de los heterocigotos (abreviadamente PAD-HET), y (c) de cada alelo (abreviadamente PAD-AL).

12.- Método, según la reivindicación 11, donde: Homocigoto significa un genotipo con alelos iguales; Heterocigoto significa un genotipo con alelos diferentes. Donde: PAD-HOM, PAD-HET y PAD-AL incluyen los productos de amplificación de los loci microsatélites de naturaleza dinucleotídica que, cuando se someten a electroforesis no desnaturizante, generan las "faint bands", las "heteroduplex bands", y las "stutter bands" y las "diagnostic shadow bands", respectivamente.

13. Método, según la reivindicaciones 10 y 12, donde: "stutter bands" son las bandas que resultan de someter los productos de amplificación generados a partir de una muestra a electroforesis no desnaturizante y,

- (a) se asocian con cada una de las "homoduplex bands"
- (b) migran más que sus correspondientes "homoduplex bands"
- (c) su intensidad disminuye gradualmente a medida que se incrementa la distancia "stutter band" - "homoduplex band"

14. Método, según la reivindicaciones 10 y 12, donde: "diagnostic shadow bands" son las bandas que resultan de someter los productos de amplificación generados a partir de una muestra a electroforesis no desnaturizante y,

- (a) se asocian con cada una de las "homoduplex bands"
- (b) migran menos que sus correspondientes "homoduplex bands"
- (c) migran más que las "faint bands" o las "heteroduplex bands" generadas a partir de los productos de amplificación de esa muestra

15. Método, según la reivindicaciones 10 y 12, donde: "faint bands" son las bandas que resultan de someter los productos de amplificación generados a partir de una muestra a electroforesis no desnaturalizante y,

5 (a) migran menos que las correspondientes "homoduplex bands" y que las "diagnostic shadow bands"

(b) generalmente se detectan si existe una única "homoduplex band"

16. Método, según la reivindicaciones 10 y 12, donde: "heteroduplex bands", son las bandas que resultan de someter los productos de amplificación generados a partir de una muestra a electroforesis no desnaturalizante y que:

10 (a) migran menos que las correspondientes "homoduplex bands" y que las "diagnostic shadow bands"

(b) generalmente se detectan si existe más de una "homoduplex band"

17.- Método y sistema electroforético, según todas las reivindicaciones anteriores, para detectar errores en el genotipado de loci microsátélites de naturaleza dinucleotídica
15 caracterizado por:

(a) mantener los homodúplexes y los PAD y tener capacidad para generar nuevos PAD;

(b) permitir resolver bandas que se diferencian entre sí en un par de bases, en un rango de tamaños comprendido, al menos, entre 70 y 220 pares de bases; y

20 (c) permitir estimar con alta precisión el tamaño correspondiente a las bandas presentes en los patrones de bandas, en un rango de tamaños comprendido, al menos, entre 70 y 220 pares de bases

18.- Método y sistema electroforético, según la reivindicación 17, caracterizado porque incluye un sistema electroforético horizontal en geles ultrafinos de poliacrilamida
25 que contienen glicerol y una concentración del "crosslinker" piperacina di-acrilamida superior al 5%, utilizando condiciones no desnaturalizantes, un sistema de tampones discontinuo borato/formato con una alta fuerza iónica y una temperatura durante la electroforesis inferior a 50°C

19.- Uso del método, según las reivindicaciones anteriores, para detectar y/o
30 prevenir errores de genotipado a partir de los productos de amplificación de más de un locus y/o en el genotipado a gran escala ("high throughput genotyping"), lo que incluye el uso de cualquier sistema parcial o totalmente automatizado.

20.- Uso del método, según las reivindicaciones anteriores, en aplicaciones tales como la diagnosis de enfermedades, la genética preimplantacional, los tests de paternidad,

los análisis forenses, la terapia génica, el transplante de tejidos y órganos, la farmacogenética, la genética de poblaciones, el mapado genómico y la genética epidemiológica.

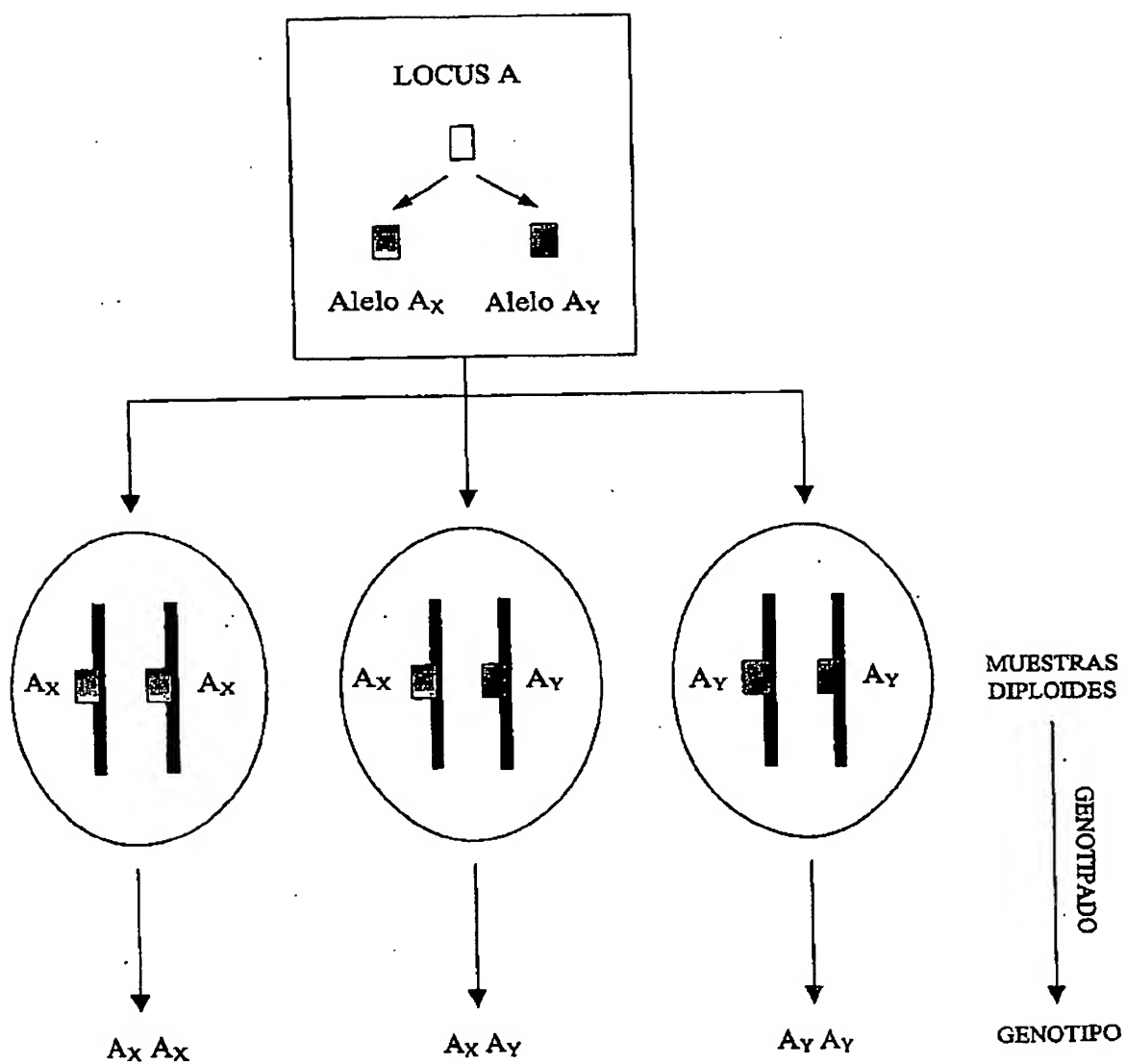


FIGURA 1

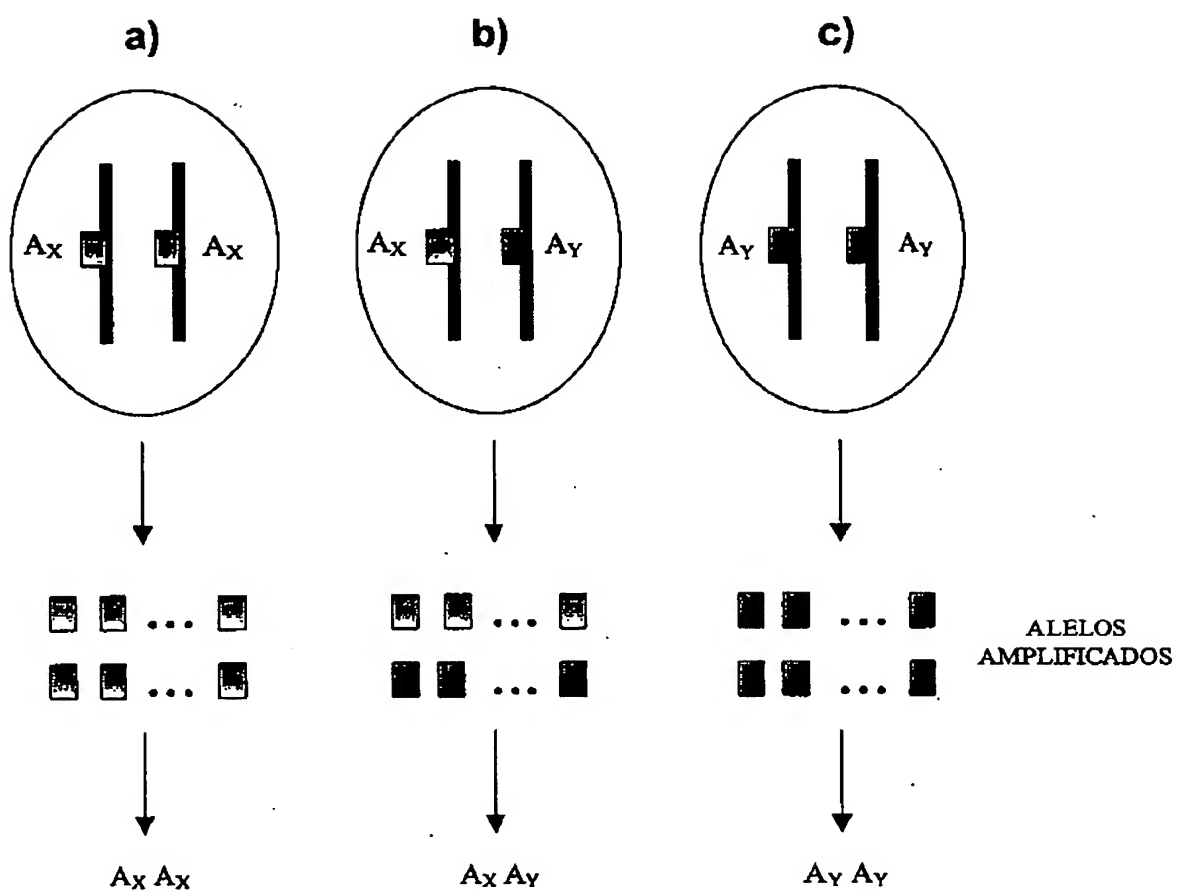


FIGURA 2

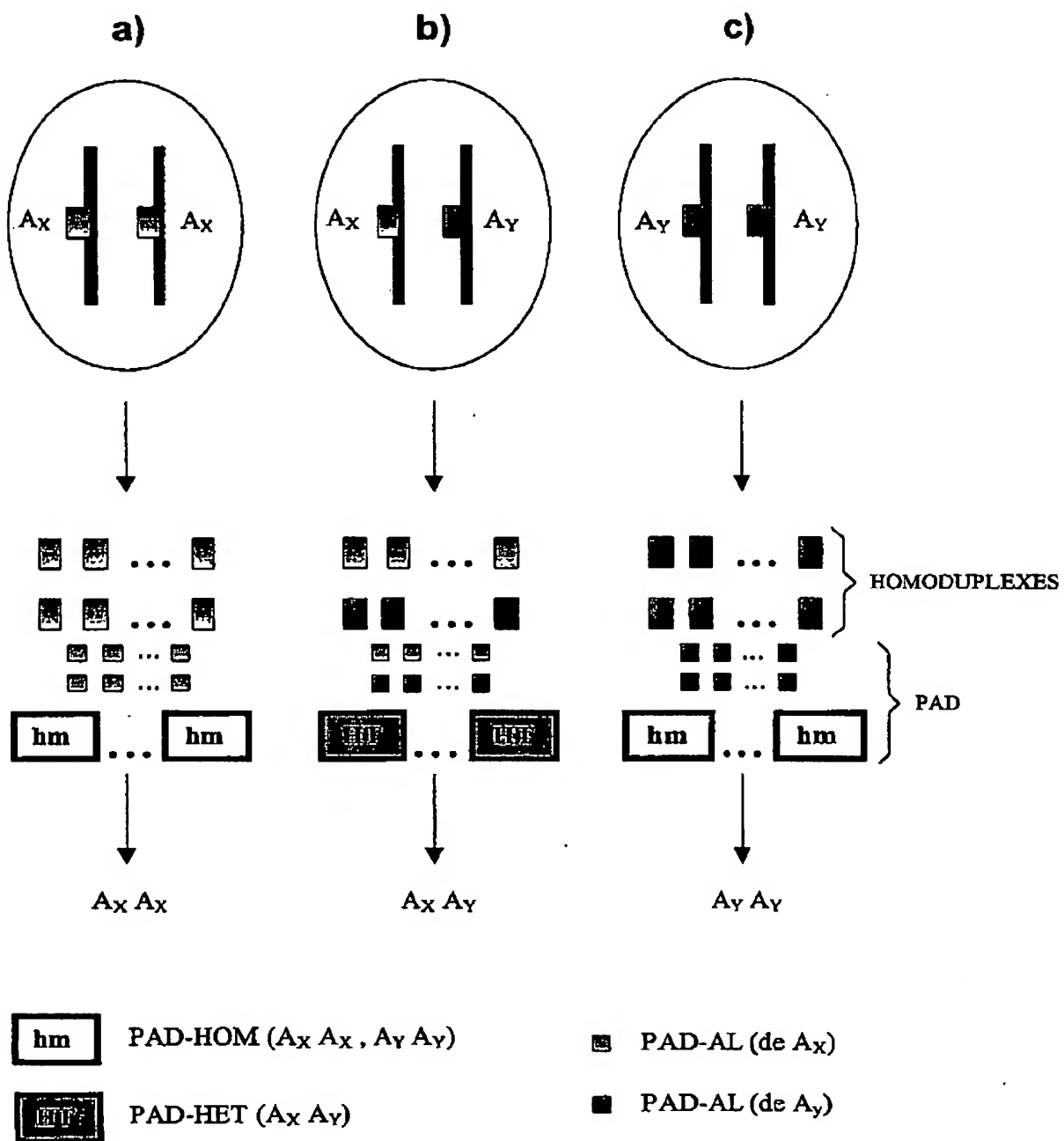
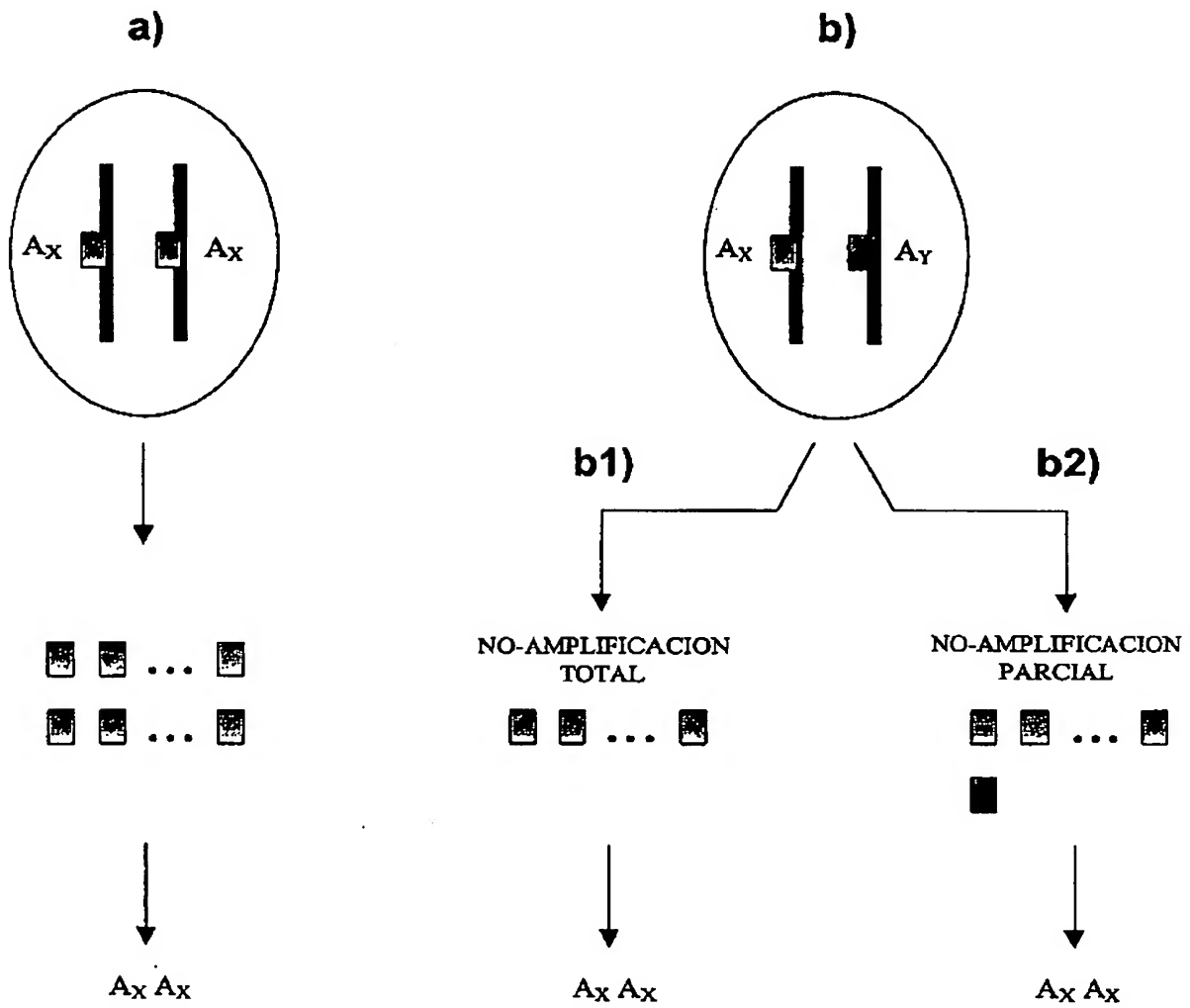


FIGURA 3



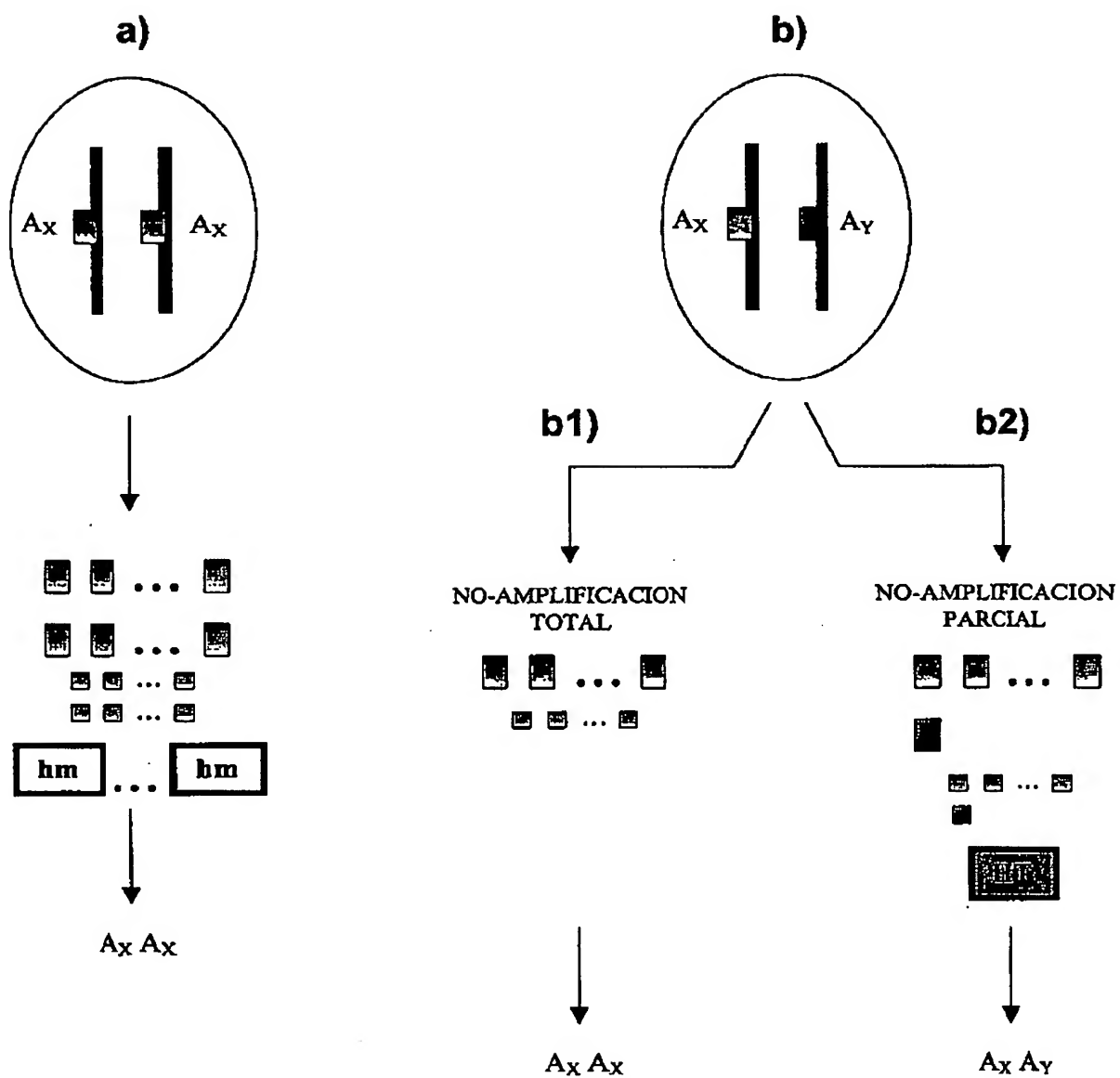


FIGURA 5

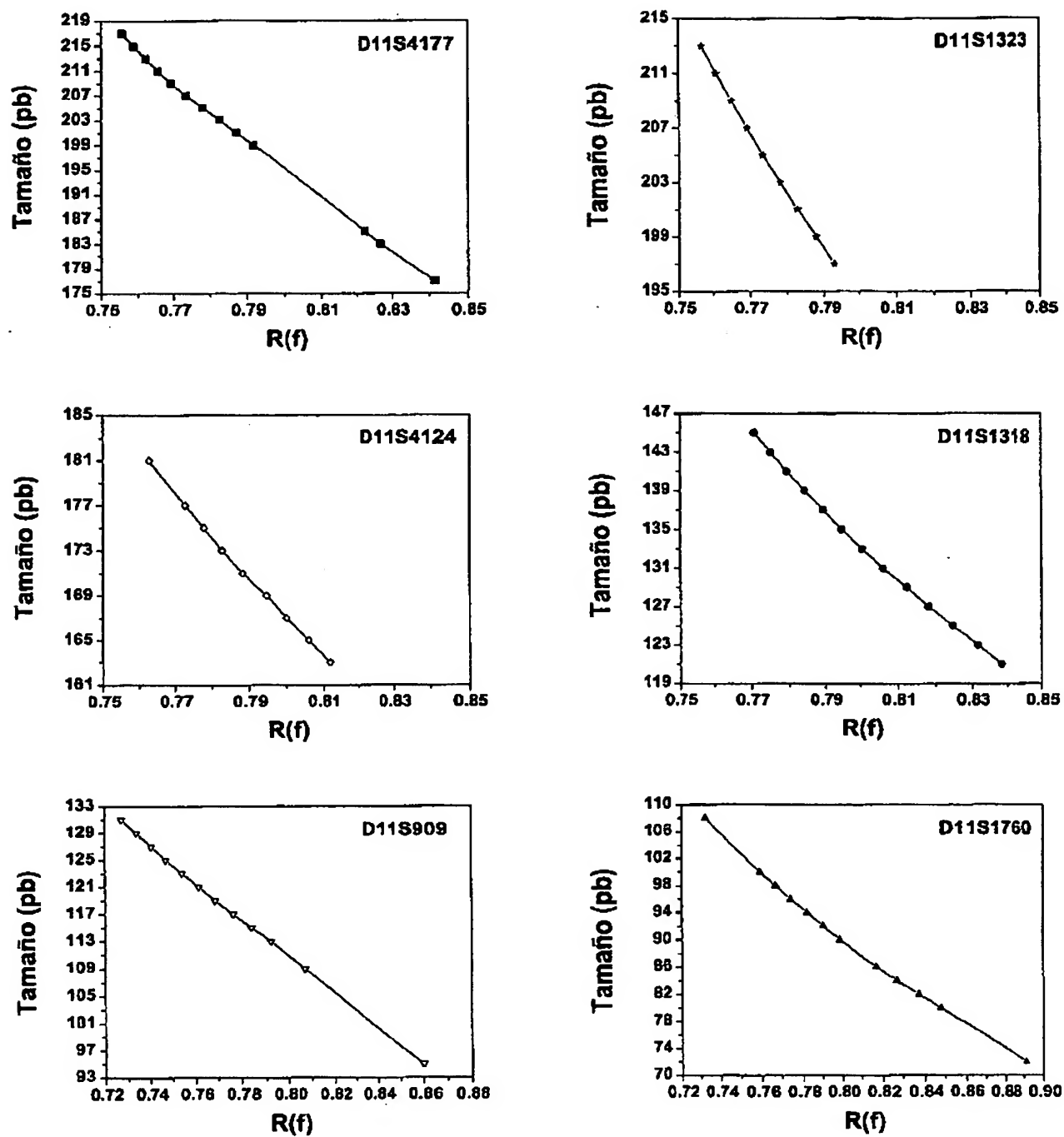


FIGURA 6

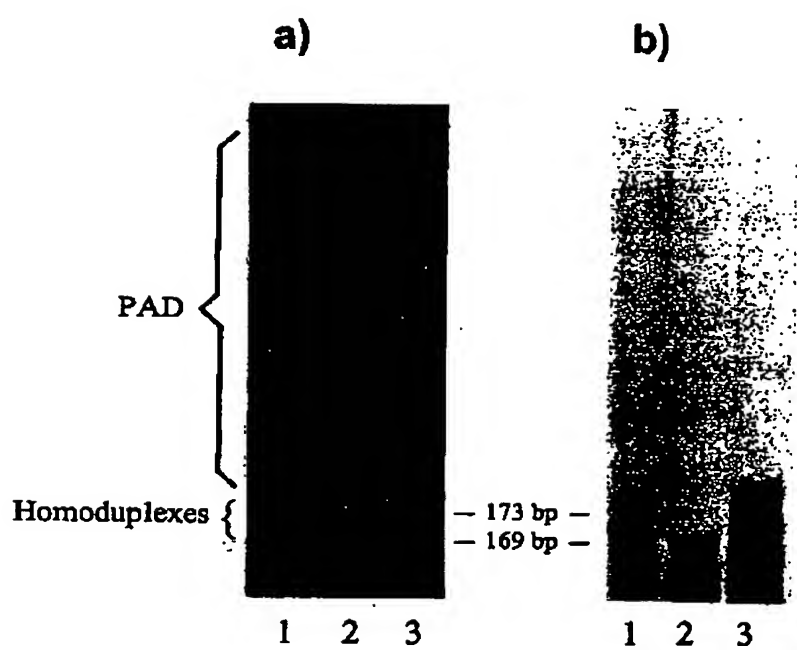


FIGURA 7

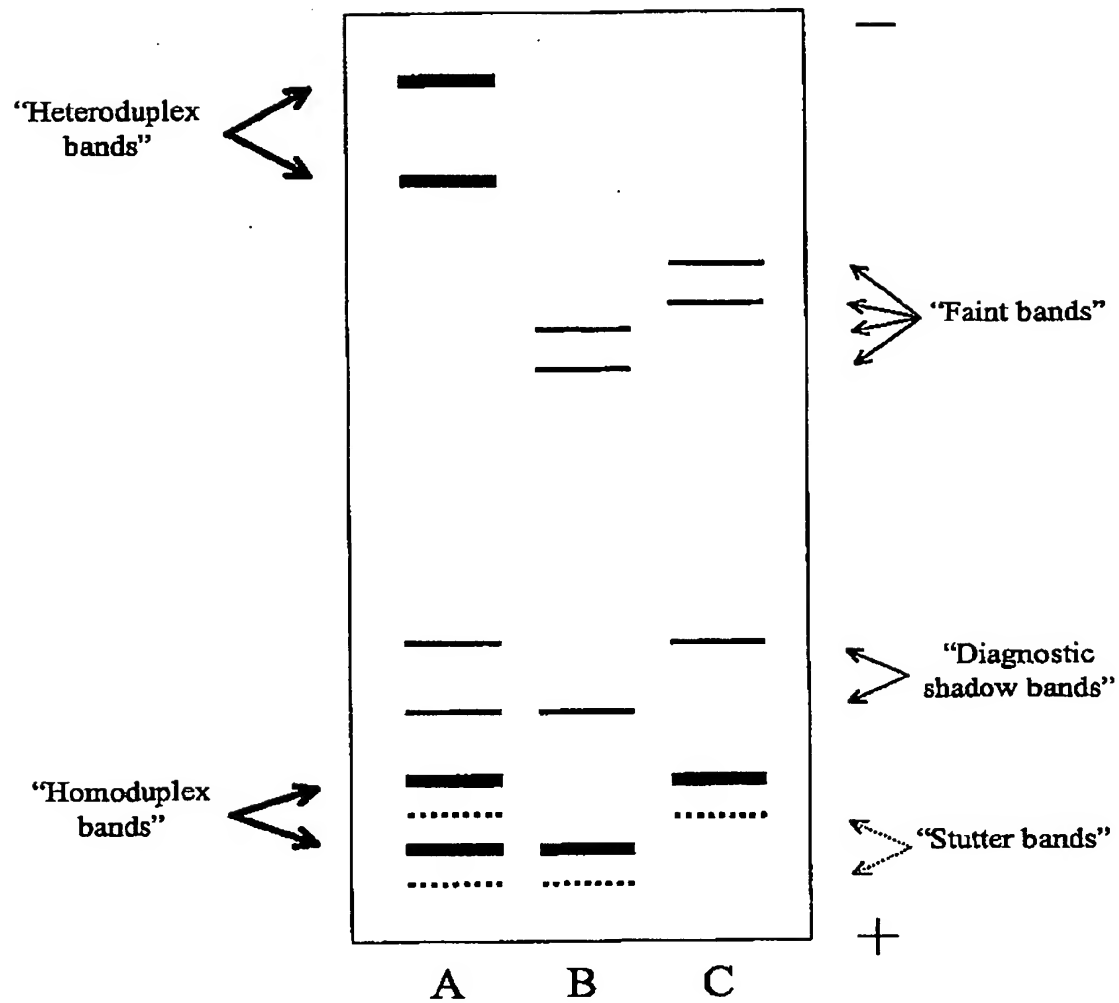


FIGURA 8

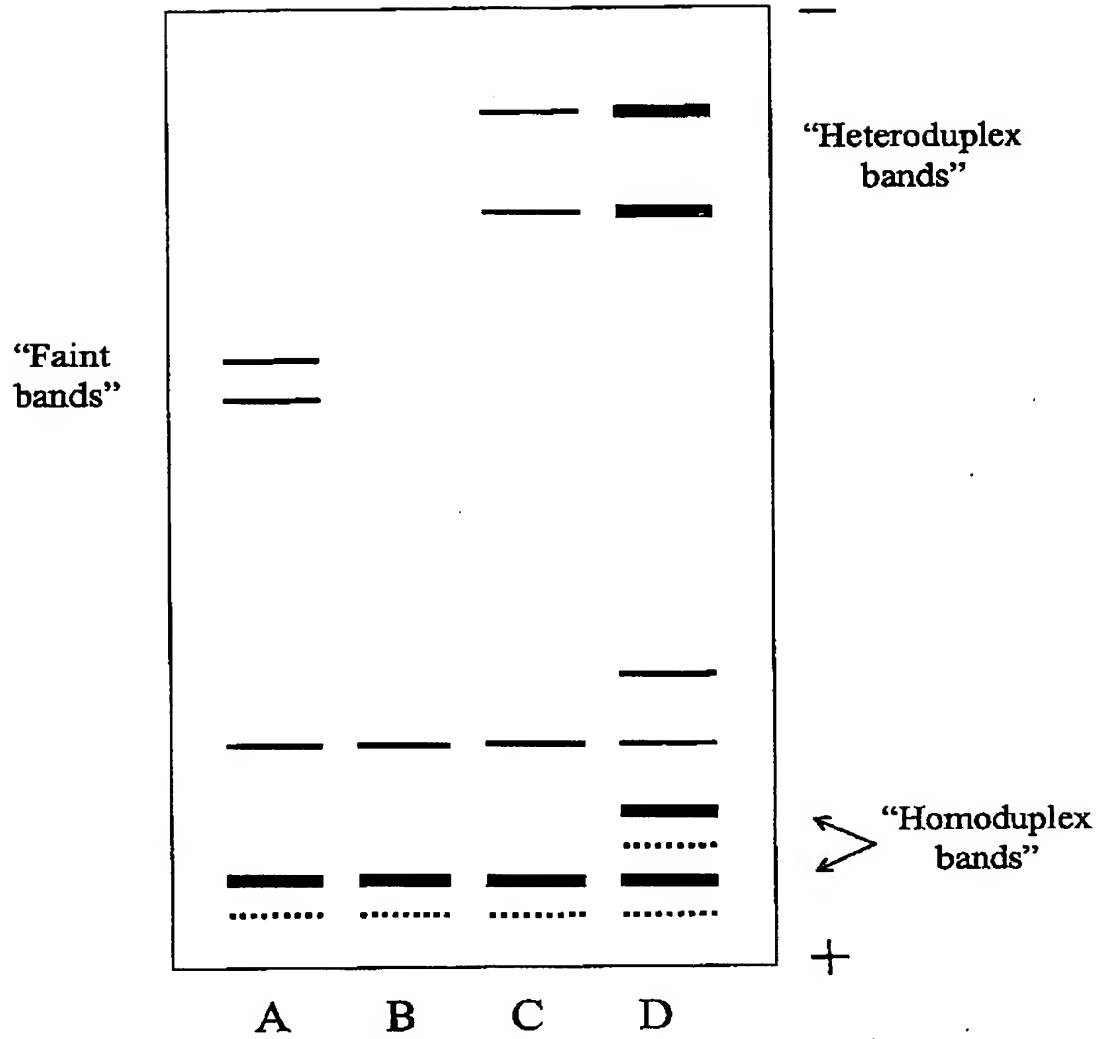


FIGURA 9

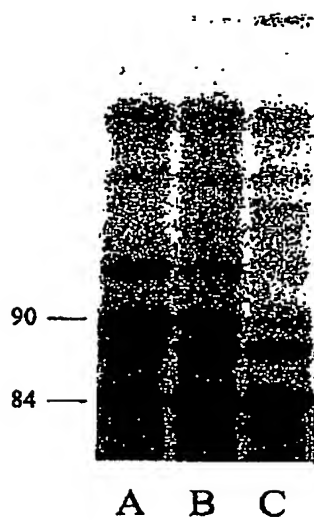


FIGURA 10

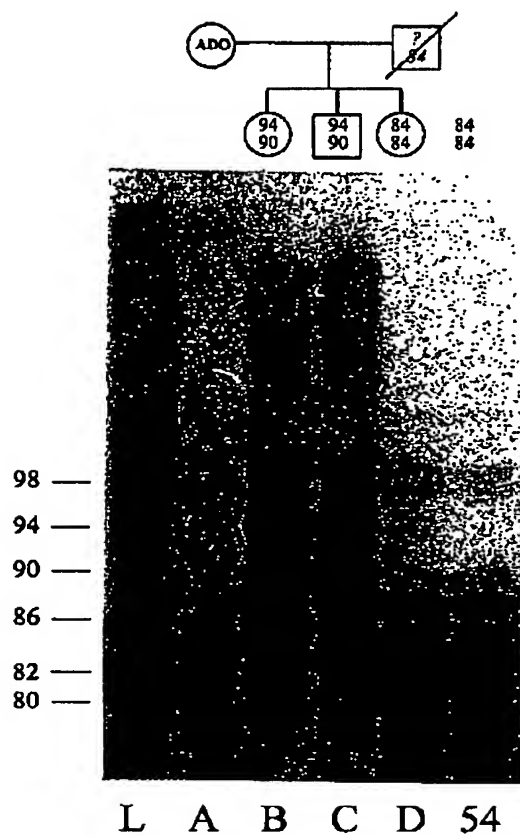
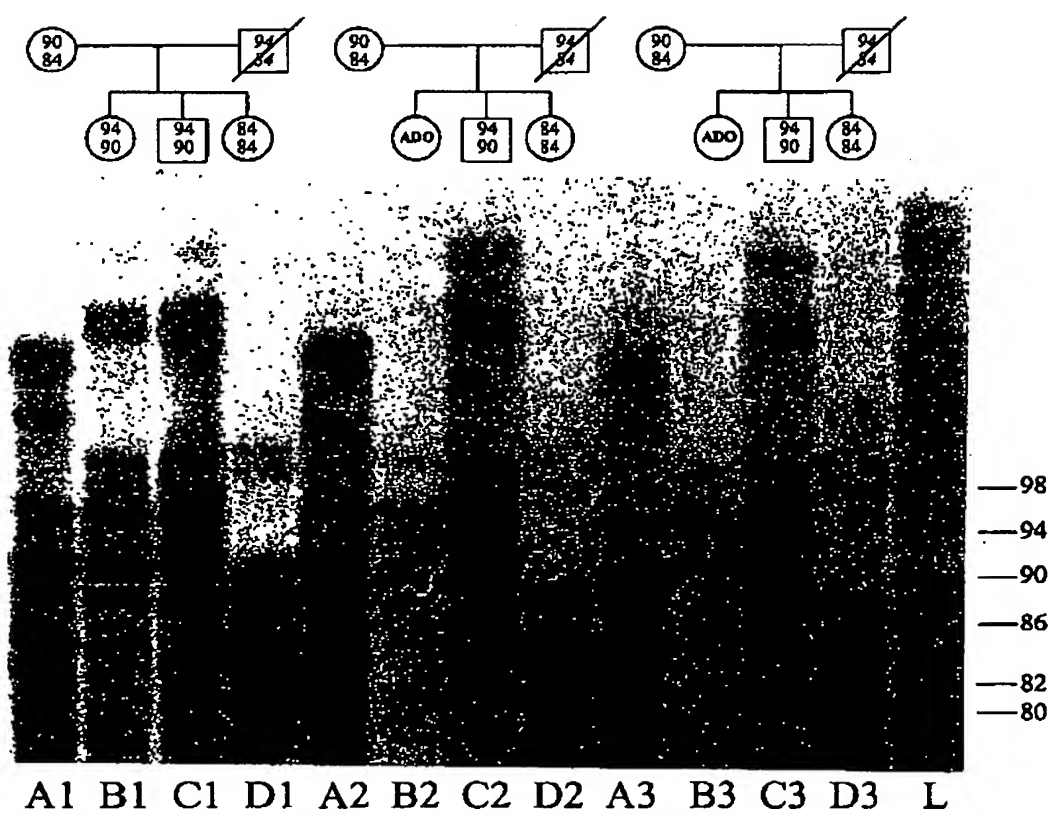


FIGURA 11

**FIGURA 12**

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de Enero de 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2003/001176 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: **C12Q 1/68**

E-15782 Santiago de Compostela (ES). **RODRIGUEZ LOPEZ, Santiago** [ES/ES]; Universidad de Santiago de Compostela, Depto de Xenetica, Facultade de Biologia, B-15782 Santiago de Compostela (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2002/000308

(22) Fecha de presentación internacional:
24 de Junio de 2002 (24.06.2002)

(74) Mandatarios: **DAVILA BAZ, Angel** etc.; c/o Clarke, Modet & Co., C/Goya No. 11, E-28001 Madrid (ES).

(25) Idioma de presentación: español

(81) Estados designados (nacional): AU, CA, US, ZA.

(26) Idioma de publicación: español

(84) Estados designados (regional): patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 0101476 26 de Junio de 2001 (26.06.2001) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA** [ES/ES]; CITI - Edificio CACTUS, Campus Sur, B-15782 Santiago de Compostela (ES).

Publicada:
— con informe de búsqueda internacional

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **ZAPATA BABIO, José Carlos** [ES/ES]; Universidad de Santiago de Compostela, Depto de Xenetica, Facultade de Biologia,

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional:
4 de Marzo de 2004

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: GEDAP METHOD (GENOTYPING BASED ON DIAGNOSTIC AMPLIFICATION PRODUCTS) FOR DETECTING AND/OR PREVENTING GENOTYPING ERRORS FROM AMPLIFICATION PRODUCTS OF A POLYMORPHIC LOCUS

(54) Título: METODO GEDAP (GENOTYPING BASED ON DIAGNOSTIC AMPLIFICATION PRODUCTS) PARA DETECTAR Y/O PREVENIR ERRORES DE GENOTIPADO A PARTIR DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACION DE UN LOCUS POLIMORFICO

(57) Abstract: The invention relates to a GEDAP method (Genotyping Based on Diagnostic Amplification Products) for detecting and/or preventing genotyping errors from amplification products of a polymorphic locus. The method is based on the joint analysis of homoduplexes and additional diagnostic products (PAD) generated from the amplification of the alleles of a polymorphic locus. The method is highly effective in detecting and/or preventing genotyping errors due to total or partial non-amplification occurring during the amplification process, including polymerase chain reaction (PCR).

(57) Resumen: Metodo GEDAP (Genotyping Based on Diagnostic Amplification Products) para detectar y/o prevenir errores de genotipado a partir de los productos de amplificación de un locus polimórfico. El metodo se basa en el analisis conjunto de homoduplexes y Productos 5 Adicionales con valor Diagnóstico (PAD) generados a partir de la amplificación de los alelos de un locus polimórfico. El metodo es altamente efectivo para detectar y/o prevenir errores de genotipado debidos a no-amplificaciones totales o parciales producidas durante el proceso de amplificación, incluida la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

WO 2003/001176 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BS02/00308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HIGASHIMOTO, TOMOYASU ET AL. "Rapid detection of FGFR mutations in syndromic craniosynostosis by temporal temperature gradient gel electrophoresis" Clinical Chemistry (1999), 45(11), 2005-2006	
A	NARITA T ET AL. "Heteroduplex analysis: a useful screening method for glycogen storage disease type Ia." Diagnostic molecular pathology, (1998 Apr) 7 (2) 111-3.	
A	MARTINELLI, GIOVANNI ET AL. "Detection of clonality by heteroduplex analysis of amplified junctional region of T-cell receptor <SYM103> in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemias" Haematologica (1997), 82(2), 161-165	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 2002 (25.11.2002)

Date of mailing of the international search report

14 January 2003 (14.01.2003)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BS02/00308

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAVAGE, DAVID A ET AL. "Detection of <SYM98>-thalassemia mutations using DNA heteroduplex generator molecules" British Journal of Haematology (1995), 90(3), 564-71	
A	WO9935284 A1 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS) 15.07.1999	
A	US5876933 A (PERLIN) 02.03.1999	
A	US5874212 A (PROCKOP ET AL.) 23.02.1999	
A	WO9501453 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 12.01.1995	
A	WO9013668 A1 (LIFECODES CORPORATION) 15.11.1990	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES02/00308

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 1-20
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/BS02/00308

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO9935284	15-07-1999	EP1044282	18-10-2000
WO9501453	12-01-1995		
WO9013668	15-11-1990	AU5645690	29-11-1990
US5876933	02-03-1999	US5541067	30-07-1996
US5874212	23-02-1999		

ISR ES 02/00308

Claims 1-20 fail to comply with the requirements of clarity and conciseness set forth in PCT Article 6. Therefore, it has been impossible to establish an international search report for the set of claims as presented in the international application.

Independently of the lack of clarity and conciseness of the claims, the search has been carried out in respect of the general inventive concept expressed by the technical information provided in the application. The inventive concept in question has been defined as follows: "Method for genotyping a polymorphic locus, based on joint analysis of the bands corresponding to the homoduplex amplification products and the minor bands (heteroduplex, faint, shadow and stutter) corresponding to amplification products PAD-HET, PAD-HOM and PAD-AL. The method comprises a first step of PCR amplification under thermal conditions (pages 18-19) that promote the development of said products, and a subsequent non-denaturing PAGE band detection step under conditions, as described in claim 18, that maintain the resulting amplification products and in turn promote the development of further products useful for genotyping. The method enables genotyping errors essentially resulting from processing errors during the PCR amplification step to be detected and/or prevented."

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES02/00308

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12Q 1/68

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C12Q 1/68

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

WPI, EPODOC, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	HIGASHIMOTO, TOMOYASU ET AL. "Rapid detection of FGFR mutations in syndromic craniosynostosis by temporal temperature gradient gel electrophoresis" Clinical Chemistry (1999), 45(11), 2005-2006	
A	NARITA T ET AL. "Heteroduplex analysis: a useful screening method for glycogen storage disease type Ia." Diagnostic molecular pathology, (1998 Apr) 7 (2) 111-3.	
A	MARTINELLI, GIOVANNI ET AL. "Detection of clonality by heteroduplex analysis of amplified junctional region of T-cell receptor <SYM103> in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemias" Haematologica (1997), 82(2), 161-165	

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicarla).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 25.11.2002

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
14 ENE 2003 14.01.03

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado
Marta Hernández Cuéllar

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

n° de teléfono + 34 91 3495545

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES02/00308

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	SAVAGE, DAVID A ET AL. "Detection of <SYM98>-thalassemia mutations using DNA heteroduplex generator molecules" British Journal of Haematology (1995), 90(3), 564-71	
A	WO9935284 A1 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS) 15.07.1999	
A	US5876933 A (PERLIN) 02.03.1999	
A	US5874212 A (PROCKOP ET AL.) 23.02.1999	
A	WO9501453 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 12.01.1995	
A	WO9013668 A1 (LIFECODES CORPORATION) 15.11.1990	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES02/00308

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 1 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°: se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones n°: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente: 1-20
3. ☐ Las reivindicaciones n°: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:

Indicación en cuanto a la reserva ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.
☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES02/00308

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO9935284	15-07-1999	EP1044282	18-10-2000
WO9501453	12-01-1995		
WO9013668	15-11-1990	AU5645690	29-11-1990
US5876933	02-03-1999	US5541067	30-07-1996
US5874212	23-02-1999		

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES02/00308

Las reivindicaciones 1-20 no cumplen los requisitos de claridad y concisión recogidos en el Artículo 6 PCT y por tanto resulta imposible realizar un informe de búsqueda internacional para el juego de reivindicaciones tal y como fue presentado en la solicitud internacional

Independientemente de la falta de claridad y concisión de las reivindicaciones, se ha efectuado una búsqueda orientada hacia el concepto inventivo general que se desprende de la la información técnica proporcionada en la solicitud. Este concepto inventivo se ha definido como: "Método de genotipado de un locus polimórfico, basado en el análisis conjunto de las bandas correspondientes a los productos de amplificación homoduplex y de las bandas menores (heteroduplex, faint, shadow y stutter) correspondientes a los productos de amplificación PAD-HET, PAD-HOM Y PAD-AL. El método consiste en una primera etapa de amplificación por PCR en condiciones técnicas (páginas 18-19) que favorezcan la aparición de estos productos y una etapa posterior de detección de las bandas realizada mediante PAGE no desnaturizante y bajo unas condiciones, descritas en la reivindicación 18, que mantengan los productos de amplificación generados y que a su vez favorezcan la aparición de otros productos útiles para el genotipado. El método permite detectar y/o prevenir errores de genotipado debidos fundamentalmente la errores de procesado durante la etapa de amplificación por PCR."